

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA - DMP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR - PPGGEv

CLARA LOUISE BARRETO XAVIER DOS SANTOS

**Análise do potencial imunomodulador de proteínas recombinantes
do *Schistosoma mansoni*, no diabetes tipo 2**

SÃO CARLOS – SP

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA - DMP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR - PPGGEv

CLARA LOUISE BARRETO XAVIER DOS SANTOS

**Análise do potencial imunomodulador de proteínas recombinantes
do *Schistosoma mansoni*, no diabetes tipo 2**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como parte do requisito para obtenção do Título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, na área de concentração de Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal – UFSCar
Coorientação: Prof.^a Dra. Cynthia Aparecida de Castro – UFSCar

SÃO CARLOS – SP

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Clara Louise Barreto Xavier dos Santos, realizada em 28/06/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Profa. Dra. Natália Mayumi Inada (IFSC/USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

DEDICATÓRIA

Sem o timão divino a guiar, a jornada deste trabalho não encontraria porto. Assim, consagro esta dissertação aos céus, em sincera gratidão pelo caminho traçado pelo coração. Pelo abraço, amor incondicional, constante amparo e zelo que moldaram cada passo de minha jornada, é com imensa gratidão que também dedico este trabalho a minha amada mãe Maristéla, fonte eterna de inspiração e guia em minha existência. A dedicação se estende, ainda, ao meu benéfico irmão Gabriel, cuja luz iluminou os caminhos mais escuros e cujo apoio tornou cada desafio possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por todas as Suas benevolências, para comigo e com aqueles que me cercam. Serei grata eternamente a minha família, por serem o alicerce, o suporte e a força motriz que me impulsiona.

Reconheço e sou agradecida por encontrar uma orientadora tão ímpar, como a Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal. Um ser humano excepcional, de uma bondade, gentileza, compreensão e carinho, difíceis de serem achados, ainda mais, associados a tamanha inteligência e perspicácia na imunologia. Agradeço-lhe, por todas as horas dedicadas, por toda a paciência, pelos ensinamentos, pela parceria, por acreditar, confiar e me incentivar sempre. Obrigada Professora, por ser meu maior exemplo de profissional e orientadora! Quando crescer quero ser como a senhora! Que Deus te ilumine sempre!

Sou imensamente grata a minha coorientadora Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro, que sempre me instiga e incentiva a melhorar e aprofundar minhas técnicas e conhecimentos de bancada. Por me inspirar e apoiar mesmo quando tudo parecia nublado e incerto demais, por sua personalidade alegre e determinada, por seus conhecimentos inigualáveis frente ao metabolismo e frente a vida. Muito obrigada pela honra de compartilharmos parte da história uma da outra.

A minha eterna gratidão a Profa Dra. Joice Margareth de Almeida Rodolpho, por ser uma mãe no LIDI. Obrigada por toda a sua paciência, por dedicar tanto do seu tempo a me ajudar, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pelos socorros até mesmo nas horas mais turbulentas. Agradeço-lhe, por toda a sua generosidade e caridade ao longo dos anos. Por ser essa pessoa tão determinada, generosa, valente, inteligente e amiga!

Agradeço ainda a Profa. Dra. Bruna Dias De Lima Fragelli, por ser essa pessoa incomparável, espirituosa e inteligente, obrigada pelos conselhos, pela parceria e incentivos.

Meus sinceros agradecimentos a toda a equipe do LIDI, que me acolheu como um membro importante e querido desta família e me instruiu a me tornar uma profissional excepcional. Agradeço de coração a cada uma de vocês!!!

Minha gratidão também se direciona a todos os pesquisadores parceiros deste projeto, que gentilmente cederam recursos intelectuais, financeiros, estruturais e insumos. Em especial a Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca do Instituto René Rachou- IRR (FIOCRUZ/MG), por acreditar na seriedade do trabalho liderado pela Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal e nos ceder suas proteínas recombinantes, frutos de seu extenso e reconhecido trabalho. A Profa. Dra.

Marcia Regina Cominetti do Departamento de Gerontologia da UFSCar, por ceder o espaço físico e equipamentos para a realização dos ensaios de citometria. E aos Prof. Dr. Flávio Henrique Silva e Anderson Ferreira da Cunha, ambos do Departamento de Genética e Evolução, por colaborarem com as questões de biologia molecular desde o início do projeto.

“As coisas podem não acontecer como planejamos, mas precisamos confiar que tudo acontece como deve ser.”

Aslam / C.S. Lewis

RESUMO

O diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) se encaixa entre as doenças classificadas como síndrome metabólica, comumente associada à obesidade e ao sedentarismo. Além disso, devido à modificação na ação da insulina, o DM2 acarreta, ao portador, quadros graves de hiperglicemia, que predispõem a complicações patológicas. Recentemente, pesquisas na área relacionaram o desenvolvimento da doença com o aumento de marcadores pró-inflamatórios, caracterizando um quadro de inflamação crônica de grau baixo, principalmente, no tecido adiposo e hepático. Sendo assim, moléculas com potencial imunomodulador possuem grande aplicabilidade no âmbito terapêutico no controle da disfunção metabólica associada à inflamação. Proteínas derivadas do parasita *Schistosoma mansoni*, vêm sendo sugeridas como reguladores de processos que podem modificar as funções de células imunológicas, diminuindo a inflamação e melhorando a tolerância à glicose. A exemplo disso, neste trabalho duas proteínas recombinantes de membrana do *S. mansoni*, Sm14 e SmCyp, foram testadas quanto suas potencialidades imunomodulatórias. Pelas análises de viabilidade celular, quantificação de citocinas, citometria de fluxo, determinação de espécies reativas de nitrogênio, e de imagens realizados, confirmou-se a considerável potencialidade imunomodulatória de tais proteínas, com alteração/diminuição na síntese de citocinas inflamatórias em macrófagos, além da polarização dos mesmos, aumento da viabilidade celular e alteração na produção de espécies reativas de nitrogênio quando comparadas ao controle celular.

Palavras-chave: DM2, *Schistosoma mansoni*, proteínas recombinantes, Sm14, SmCyp, imunomodulação, inflamação.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (DM2) fits among diseases classified as metabolic syndrome, commonly associated with obesity and sedentary lifestyle. Furthermore, due to the modification in insulin action, DM2 leads to severe cases of hyperglycemia in the carrier, predisposing to pathological complications. Recently, research in the field has linked the development of the disease with an increase in pro-inflammatory markers, characterizing a low-grade chronic inflammation, mainly in adipose and hepatic tissues. Therefore, molecules with immunomodulatory potential have significant applicability in the therapeutic scope in controlling metabolic dysfunction associated with inflammation. Proteins derived from the parasite *Schistosoma mansoni* have been suggested as regulators of processes that can modify the functions of immune cells, reducing inflammation and improving glucose tolerance. As an example, in this work, two recombinant membrane proteins of *S. mansoni*, Sm14 and SmCyp, were analyzed for their immunomodulatory potential. Through cell viability analyses, cytokine quantification, flow cytometry, determination of reactive oxygen and nitrogen species, and imaging, the considerable immunomodulatory potential of such proteins was confirmed, with alteration/decrease in the synthesis of inflammatory cytokines in macrophages, as well as their polarization, increased cell viability, and alteration in the production of nitrogen reactive species when compared to the control group.

Keywords: DM2, *Schistosoma mansoni*, recombinant proteins, Sm14, SmCyp, immunomodulation, inflammation.

LISTA DE ABREVIACOES

AML 12	Linhagem de hepatcito murino
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfcito T citotóxico
Cyps	Proteínas ciclofilinas
DC	Células dendrticas
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
DMEM F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Ham F12
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufxido
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FABS	Familia das proteínas ligadoras de ácidos graxos intracelulares
FACS	Fluorescente Activated Cell Sorter
IDF	International Diabetes Federation
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G subclasse 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-25	Interleucina 25
IL-33	Interleucina 33
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
ILC2	Células linfides inatas do tipo 2
IRR	Instituto René Rachou (FIOCRUZ/MG)
J774.A1	Linhagem de macrófago murino
LIDI	Laboratório de Inflamao e Doenças Infecciosas
M1	Macrófagos ativados classicamente
M2	Macrófagos ativados alternativamente
MBP	Proteína básica principal
MIIs	Moléculas imunomodeladoras
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina

PBS	Tampão fosfato-salino
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PT	Proteínas totais
RELM- α	Molécula α do tipo resistina
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio
Sm14	Proteína recombinante de Schistosoma mansoni pertencente à família das FABS
SmCyp	Proteína recombinante de Schistosoma mansoni pertencente à família das Cyps
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador β
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th17	Linfócitos T auxiliares efetores
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
Treg	Linfócitos T reguladores
TSLP	Linfoietina estromal tímica
VN	Vermelho neutro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síndrome metabólica	15
Figura 2: Complicações do diabetes mellitus.	16
Figura 3: Indução e regulação da resposta imune do tipo 2 mediada por helmintos.	21
Figura 4: Ensaio piloto de viabilidade celular	33
Figura 5: Viabilidade das células de macrófagos J774.A1 ao tratamento com a proteína recombinante Sm14.....	34
Figura 6: Viabilidade das células de macrófagos J774.A1 ao tratamento com a proteína recombinante SmCyp	35
Figura 7: Viabilidade das células de hepatócitos AML 12 ao tratamento com a proteína recombinante Sm14.....	37
Figura 8: Viabilidade das células de hepatócitos AML 12 ao tratamento com a proteína recombinante SmCyp	38
Figura 9: Análise morfológica dos macrófagos da linhagem J774.A1 frente aos tratamentos com as proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp em 24 e 48 horas	40
Figura 10: Análise morfológica dos hepatócitos da linhagem AML 12 frente aos tratamentos com as proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp em 24 e 48 horas	42
Figura 11: Ensaio de polarização de macrófagos e imunomodulação de proteínas recombinantes do <i>Schistosoma mansoni</i> por citometria de fluxo.	44
Figura 12: Quantificação pela Reação de Griess da produção de NO ²	46
Figura 13: Quantificação por ELISA direto das citocinas IL-6 e TNF- α	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 SÍNDROME METABÓLICA	15
1.1.1 Diabetes mellitus.....	16
1.1.2 Inflamação Crônica de Baixo Grau em Síndromes Metabólicas.....	18
1.2 IMUNOMODUÇÃO HELMÍNTICA	20
1.2.1 Imunomodulação do <i>Schistosoma mansoni</i>	23
1.3 PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO <i>Schistosoma mansoni</i> ALVOS DO ESTUDO ..	24
1.3.1 Sm14	24
1.3.2 SmCyp.....	24
2. OBJETIVOS.....	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Sm14 e SmCyp DO <i>Schistosoma mansoni</i>	25
3.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO <i>Schistosoma mansoni</i>	26
3.3 CULTIVO CELULAR	26
3.3.1 Cultivo de macrófagos J774.A1	26
3.3.2 Cultivo de hepatócitos AML12.....	26
3.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DO MTT.....	27
3.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DA CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (VN).....	28
3.6 MORFOLOGIA CELULAR.....	28
3.7 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	29
3.8 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DA REAÇÃO DE Griess.....	30
3.8.1 Macrófagos J774.A1	30
3.9 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS POR ELISA.....	30
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 TESTES DE AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIOS DO MTT E VN.....	32
4.1.1 Ensaio MTT piloto para os delineamentos experimentais subsequentes	32

4.1.2 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos J774.A1 com a proteína Sm14	34
4.1.3 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos J774.A1 com a proteína SmCyp...	35
4.1.4 Ensaio de viabilidade celular de hepatócitos AML 12 com a proteína Sm14	36
4.1.5 Ensaio de viabilidade celular de hepatócitos AML 12 com a proteína SmCyp....	38
4.2 ANÁLISES DAS MORFOLOGIAS CELULARES	40
4.2.1 Macrófagos J774.A1	40
4.2.2 Hepatócitos AML 12.....	42
4.3 CITOMETRIA DE FLUXO.....	43
4.4 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DA REAÇÃO DE Griess.....	45
4.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS POR ELISA.....	47
5. CONCLUSÕES.....	49
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

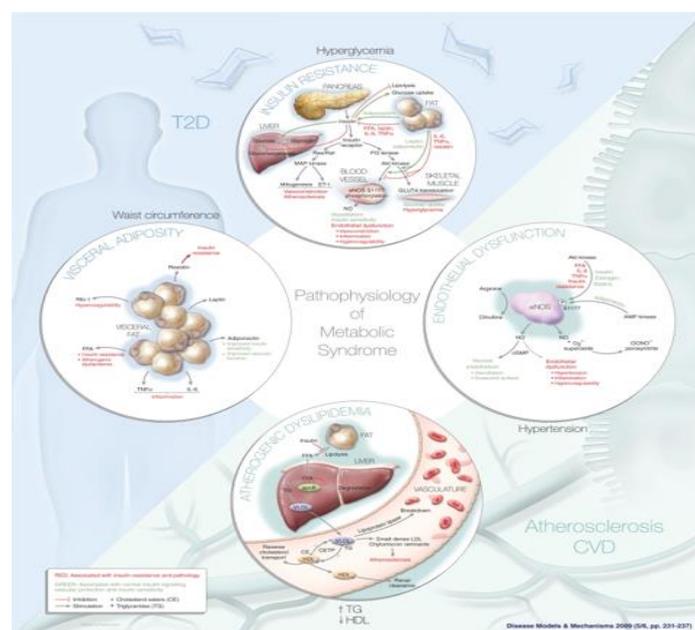
1 INTRODUÇÃO

No decorrer das últimas décadas, as doenças endócrino-metabólicas vêm ganhando enfoque no meio científico com estudos envolvendo suas etiologias, prevenções e tratamentos, principalmente acerca do diabetes e da obesidade, muito disso é atribuído aos elevados níveis epidemiológicos associados às altas taxas de mortalidade e morbidade dos acometidos. Uma das ferramentas promissoras no controle da inflamação crônica de baixo grau, característica de tal distúrbio metabólico, é a imunomodulação que parasitas helmínticos conseguem executar em seus hospedeiros.

1.1 SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica, apesar de silenciosa, refere-se à co-ocorrência de um conjunto de desordens de riscos cardiovasculares ateroscleróticas e diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2), como a dislipidemia aterogênica, hipertensão, resistência à insulina, disfunção endotelial e obesidade (Figura 1), que se inter-relacionam e compartilham mediadores, vias e mecanismos fisiopatológicos comuns. Neste último aspecto, apesar de não consensual, é irrefutável que a fisiopatologia da síndrome seja resultante da complexa interação entre fatores genéticos e ambientais (BOVOLINI *et al.*, 2020; HUANG, 2009).

Figura 1: Síndrome metabólica



A síndrome metabólica pode ser compreendida como uma associação de sinais, podendo ser diagnosticada, segundo o *National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III)*, se três ou mais dos cinco critérios relacionados a resistência à insulina, obesidade, hipertensão e dislipidemia, forem atendidos. Fonte: Adaptado de Huang, 2009.

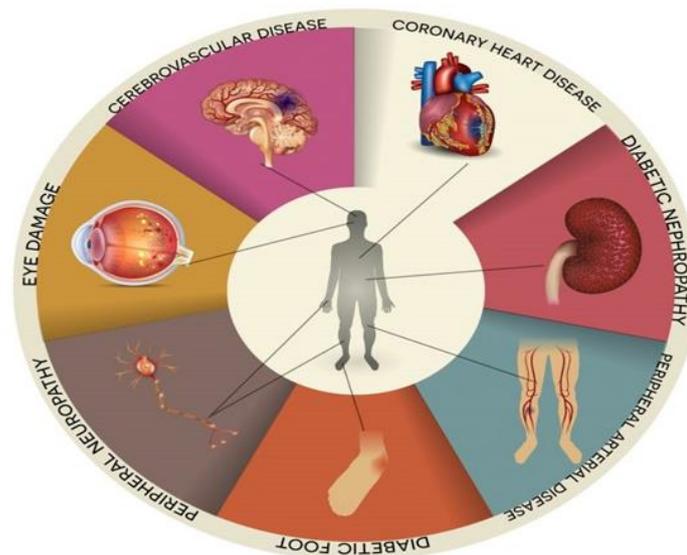
Utilizar como bases de medida essa consociação de sintomas, hiperglicemia/resistência à insulina, obesidade e dislipidemia (Figura 1), no diagnóstico clínico da síndrome, garante que a doença possa ser compreendida e tratada como um processo fisiopatológico complexo de doenças interdependentes. Ajudando, ainda, na triagem de pacientes com maior propensão de desenvolvimento do DM2 e/ou doenças cardiovasculares, além de facilitar estudos epidemiológicos e clínicos de abordagens farmacológicas, de estilo de vida e tratamentos preventivos.

1.1.1 Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina ou ainda da incapacidade da mesma de exercer adequadamente seus efeitos, o que em suma pode gerar ou agravar outros quadros de distúrbios, seja no metabolismo de carboidratos, proteínas ou gorduras (Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), 2019; BREITSAMETER *et al.*, 1994).

Suas complicações frequentemente se relacionam negativamente com a produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos acometidos, que envolvem a hipoglicemia, o estado hiperglicêmico hiperosmolar, cetoacidose diabética, retinopatia, cardiopatia isquêmica, neuropatias, doença cérebro vascular e vascular periférica (Figura 2) (SBD, 2020; McLELLAN *et al.*, 2017; CORTEZ *et al.*, 2015).

Figura 2: Complicações do diabetes mellitus.



Dentre as complicações mais recorrentes do DM se encontram a doença cardíaca coronariana, nefropatia diabética, doença arterial periférica, pé diabético, neuropatia periférica, danos oculares (retinopatia) e doenças cerebrovasculares, que levam a internações e intervenções cirúrgicas frequentes dos pacientes. Além disso, a maioria das complicações são silenciosas, reforçando a necessidade do rastreamento precoce, já que podem levar a sequelas irreparáveis e diminuição da expectativa de vida dos acometidos. Fonte: LIDIA - Liga Interdisciplinar de Diabetes, Complicações do Diabetes. UFMG, 2017.

Em termos globais o número de acometidos quadruplicou nas últimas três décadas, segundo a *International Diabetes Federation* (IDF) cerca de 537 milhões de adultos (20 a 79 anos) eram portadores da doença em 2021, destes 90% tinham o DM2. A estimativa é de que em 2030 sejam 643 milhões e em 2045, 783 milhões de acometidos. Outro dado importante, segundo o órgão, é que três em quatro adultos com DM vivem em países em desenvolvimento e subdesenvolvimento, e quase um em cada dois (240 milhões) dos portadores não possuem o diagnóstico. Os gastos com o tratamento da doença e suas complicações chegam a US\$ 966 bilhões e ainda existe a estimativa de que 541 milhões de adultos corram maior risco de desenvolver o DM2 (IDF, 2021).

1.1.1.2 Diabetes mellitus do tipo 2

Devido ao grandioso número de acometidos e os investimentos envolvidos no controle glicêmico e tratamento das complicações, o DM2 é considerado uma das doenças de maior impacto global, sendo o principal responsável pelo elevado percentual de morbidade e

mortalidade associadas a distúrbios metabólicos. As estimativas cada vez mais “inflacionadas” com relação ao índice de portadores da doença, são mais evidentes em países de baixa e média renda, onde 75% da população e mais 80% de todos os diabéticos sem o diagnóstico vivem. Características genéticas podem determinar em parte a suscetibilidade individual ao DM2, porém, uma dieta desbalanceada, um estilo de vida sedentário, o envelhecimento populacional, a rápida transição socioeconômica com a industrialização e a urbanização, impulsionam o seu avanço (ZHENG *et al.*, 2017; PRADEEPA *et al.*, 2017).

A doença é resultante de graus variáveis de resistência insulínica sistêmica e deficiência relativa de secreção do hormônio pelo pâncreas, tendo a maioria dos acometidos excesso de peso. Ou seja, tem como principal colaborador a inflamação do tecido adiposo, o qual sofre modificações metabólicas, como aumento de lipólise, e elevação de migração e/ou diferenciação de células imunitárias inflamatórias residentes nesse tecido. Entre as quais se destacam macrófagos, linfócitos T e B, neutrófilos, entre outras, que corroboram para síntese de citocinas inflamatórias e adipocinas (SBD, 2003; GOMES *et al.*, 2018).

Desta forma, a compreensão acerca do DM2 transcende as questões glicêmicas, devendo-se, portanto, ser analisada sob a ótica de uma doença inflamatória crônica, onde a resistência a insulina, ineficiência das células β e, concomitantemente, o aumento do tecido adiposo associado, contribuem para a ativação do sistema imunológico. Onde a tríade inflamação-obesidade-resistência à insulina culminam na expressão de marcadores imunoinflamatórios importantes como adipocinas, dentre elas a adiponectina e proteína C reativa, e citocinas como a IL-6 e TNF- α , por exemplo (GOMES *et al.*, 2018; ROMANCIUC, 2017).

1.1.2 Inflamação Crônica de Baixo Grau em Síndromes Metabólicas

O DM2 e a obesidade, apresentam quadro de inflamação crônica de baixo grau, resultantes das alterações metabólicas, cujo excesso de nutrientes vindos da dieta, contribuem para o aumento da resistência à ação da insulina, específica aos tecidos, acarretando complicações associadas ao DM2 nos rins, artérias e olhos. Sendo assim, a inflamação é considerada um ponto central no DM2 e seus desmembramentos (XIA *et al.* 2017).

Sabendo-se disso, os macrófagos são, portanto, as células imunes inatas que detêm o principal controle sob a homeostase, além de, coordenarem as reações inflamatórias e curativas (GORDON *et al.*, 2014). Além disso, derivam dos monócitos circulantes, ativamente recrutados em tecidos com alteração da atividade metabólica, como o tecido adiposo e hepático, ocorrendo

tanto na obesidade quanto no DM2. Por possuírem papel importante no metabolismo, nesses tecidos o aumento da infiltração de macrófagos é ainda maior em comparação com o tecido normal, o que é, parcialmente, dependente da liberação de citocinas pelos adipócitos (MOGANTI *et al.*, 2017).

Com isso, os adipócitos brancos podem secretar fatores que estimulam a produção de marcadores inflamatórios pelo fígado e outros órgãos, que no que lhe concerne, podem também produzir e liberar citocinas que estimularão ainda mais o tecido adiposo. Portanto, o aumento do nível circulante desses marcadores inflamatórios reflete uma produção aumentada da massa adiposa branca (SALTIEL and KAHN, 2001; REILLY and SALTIEL, 2017).

Ou seja, nas condições de hiperplasia dos adipócitos e infiltração de macrófagos e linfócitos no tecido adiposo, as citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α , são secretadas em excesso. Atuando na redução da cadeia de sinalização insulínica e consequente translocação de glicose, bem como alteração da homeostase energética e massa corporal, contribuindo para o desencadeamento do DM, por resistência à ação da insulina. Já o mediador inflamatório IL-1 β , influencia diretamente na patogenia do DM, por contribuir para a falha das células β . As próprias células β secretam IL-1 β , após estimulação com glicose. Além disso, essa interleucina, estimula sua própria produção em células β e atrai macrófagos que podem atuar como uma fonte extra de IL-1 β e outras citocinas inflamatórias. Ou seja, ela contribui para a inflamação pós-prandial aguda e aumento da secreção de insulina pós-prandial, através do receptor IL-1 das células β , sendo sua ação dependente de glicose e insulina (GOMES *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2014).

Em contrapartida, a IL-10 pode apresentar funções imunossupressoras e antiangiogênicas, desempenhando, assim, um papel protetor no DM2 por inibir a ativação de macrófagos. Deficiências na expressão de IL-10 ou sinalização do receptor de IL-10, resultam em doenças inflamatórias. Estudos anteriores, constataram que camundongos projetados para expressar IL-10 ectopicamente por meio de transferência de genes ou por meio de um transgene específico de células musculares, foram parcialmente protegidos da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica e da intolerância à glicose. Sugerindo assim, que essa interleucina pode estar envolvida na inflamação relacionada ao DM2 (BARRY, *et al.*, 2016).

Além de terem papel fundamental na inflamação, essas citocinas podem estimular ainda diferenciação de macrófagos em dois tipos, os M1 (ativados classicamente) liberam citocinas pró-inflamatórias, que incluem o TNF- α e as interleucinas IL-6 e IL-1 β , que contribuem para o desenvolvimento da inflamação local e da inflamação sistêmica (WENSVEEN *et al.*, 2015). E os do tipo M2 (ativados alternativamente) secretam a interleucina 10 (IL-10), que tem potencial

de inibição da atividade da maioria das pró-inflamatórias, incluindo os M1 (LUMENG *et al.*, 2007; WENSVEEN *et al.*, 2015).

A polarização dos macrófagos anti-inflamatórios M2 para pró-inflamatórios M1 pode ser um fator importante no desenvolvimento da obesidade e DM2 (WENSVEEN *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018), já que a obesidade está associada com o acúmulo de macrófagos no tecido adiposo. Além disso, a concentração desses macrófagos no referido tecido, difere dependendo do seu estado metabólico (SU *et al.*, 2018). Sendo assim, tanto o aumento do número de macrófagos, como o aumento da proporção de M1 para M2, são características da inflamação do tecido adiposo que, acompanha a obesidade e está associada ao desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (REILLY and SALTIEL, 2017).

Portanto, o entendimento da imunidade na regulação do metabolismo e o papel do metabolismo na regulação imunológica, são de fundamental importância nesta temática, possibilitando o desenvolvimento de uma nova área da biologia: o imunometabolismo (GUZIK *et al.*, 2017). Apesar, das características da inflamação crônica relacionada ao metabolismo diferirem das respostas inflamatórias agudas a estímulos exógenos, há evidências de que muitos mecanismos de detecção de patógenos da imunidade inata são reguladores negativos da sensibilidade à insulina (TANG *et al.*, 2018). Neste contexto, parasitas helmínticos são associados à proteção contra condições inflamatórias, tanto em humanos quanto em modelos animais, isso porque possuem uma série de mecanismos imunomoduladores que afetam todas as facetas da resposta imunológica do hospedeiro a fim de garantir sua permanência no organismo (SU *et al.*, 2018; MAIZELS *et al.*, 2016). Em outras palavras, esses parasitas conduzem a uma possível regulação do sistema imunológico, anulando a capacidade do hospedeiro de expulsá-los, atenuando em simultâneo a reatividade a muitos processos inflamatórios (SU *et al.*, 2018).

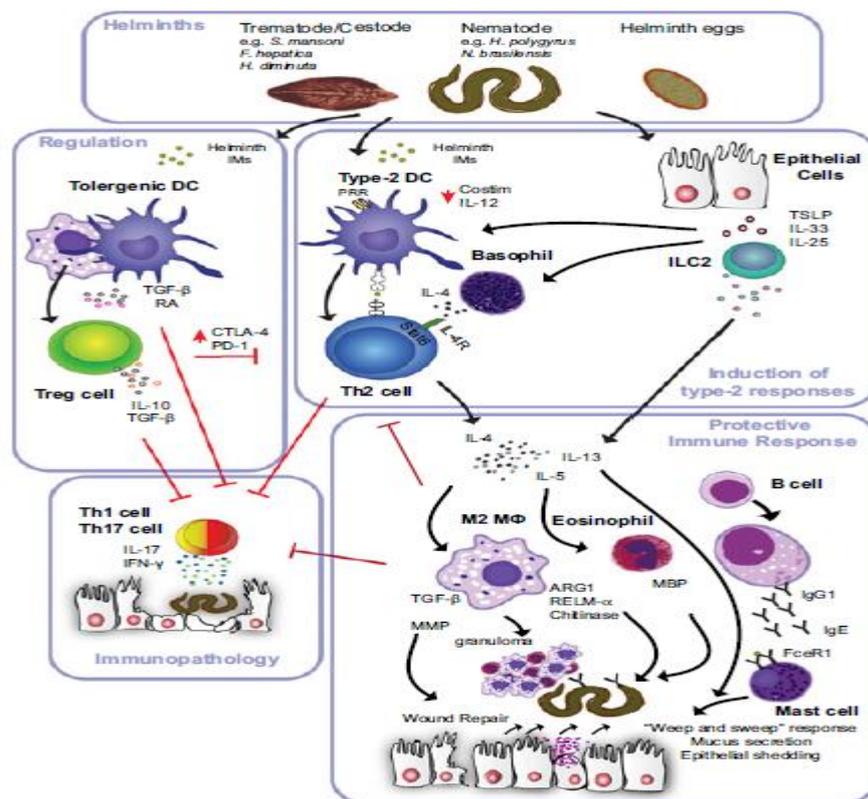
1.2 IMUNOMODUÇÃO HELMÍNTICA

Durante a evolução, os helmintos aprenderam a suprimir a defesa do hospedeiro e estabelecer infecções crônicas que podem durar até 20 anos, tais mecanismos imunomoduladores conseguem alterar em um amplo espectro a responsividade do sistema imunológico de seus hospedeiros. Ou seja, a resposta imune silenciada em infecções parasitárias, fazem com que o infectado acomode e tolere o invasor, podendo acarretar consequências benéficas, como a supressão de danos colaterais durante a infecção parasitária e de reações alérgicas, autoimunes e inflamatórias reduzidas, quanto consequências nefastas,

como a redução das respostas vacinais, aumentando a suscetibilidade à coinfeção e redução parcial da imunovigilância (MAIZELS *et al.*, 2016; MAIZELS *et al.*, 2018; BOHNACKER *et al.*, 2020).

Conforme exemplificado na Figura 3, os danos causados pela migração dos vermes nos diferentes tecidos, bem como a produção de ovos e a secreção de moléculas imunomoduladoras (MIs), são primeiramente reconhecidos, para então haver a indução das células Th2. Acarretando uma resposta imunitária do tipo 2 no hospedeiro e, conseqüentemente, sua regulação, e até mesmo uma possível imunopatologia quando tal resposta é inadequada.

Figura 3: Indução e regulação da resposta imune do tipo 2 mediada por helmintos.



Helmintos induzem uma imunidade mediada por células do tipo 2 protetoras do hospedeiro, que limita a inflamação do tipo 1 e garante a sobrevivência do verme em seu hospedeiro. Essa resposta do tipo 2 é iniciada com a danificação epitelial do hospedeiro, que secreta alarminas [interleucina 25 (IL-25), IL-33 e TSLP] que ativam e recrutam células linfoides inatas tipo 2 (ILC2) e CD4 + linfócitos T auxiliares 2 (Th2). A produção de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13), bem como fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), por essas células induz eosinofilia, polarização de macrófagos M2 e a secreção de imunoglobulinas IgG1, IgG4 e IgE. Fonte: Adaptado de FINLAY *et al.*, 2014; BOHNACKER *et al.*, 2020.

A detecção e indução de células Th2 (Figura 3), se dá quando as citocinas alarminas, IL-25, IL-33, e a linfopietina estromal tímica (TSLP), produzidas por células epiteliais em

resposta à infecção por helmintos, ativam células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) que produzem as citocinas protetoras do tipo 2, IL-5 e IL-13. Já as MIs, derivadas dos parasitas, podem ligar-se a receptores de reconhecimento de padrões em células dendríticas (DC) e inibir a expressão e produção de moléculas co-estimuladoras de IL-12, favorecendo a diferenciação das células Th2. Ao mesmo tempo, a TSLP induz a produção de IL-4 por basófilos, sendo a IL-4 crítica na diferenciação de células Th2 (FINLAY *et al.*, 2014; BOHNACKER *et al.*, 2020).

Na sequência, a resposta imunitária protetora (Figura 3) se inicia com as células Th2 antiparasitas produzindo IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 e a IL-5 atuam sobre as células B induzindo a comutação das classes IgG1 e IgE. A IgE antiparasita liga e ativa os mastócitos, que irão liberar moléculas inflamatórias. A IL-5 ainda, promove a expansão e ativação de eosinófilos, que produzem proteínas granuladas, tais como a proteína básica principal (MBP), que podem causar danos diretos nos helmintos. Em contrapartida, a IL-4 e a IL-13 promovem a diferenciação dos macrófagos a perfil M2. Os macrófagos M2 com os eosinófilos, encapsulam helmintos ligados a anticorpos em granulomas, tipo 2. Além disso, os M2 produzem também moléculas que danificam diretamente os parasitas, incluindo RELM- α e quitinase. A arginase expressa pelos macrófagos M2 matam à fome os helmintos ao esgotar a L-arginina. Os macrófagos, alternativamente ativados, desempenham ainda um papel na promoção da reparação de feridas durante a infecção por libertação de TGF- β , RELM- α e metaloproteinases de matriz. E por último, a IL-13 tem também efeito direto nos tecidos mucosos, promovendo a descamação do tecido epitelial e a secreção de muco pelas células caliciformes que auxiliam na remoção dos helmintos (FINLAY *et al.*, 2014; MOTRAN *et al.*, 2018).

A questão de maior preocupação aqui, é quanto uma resposta inadequada de Th1 ou Th17 a um helminto, levando a destruição dos tecidos do hospedeiro pela inflamação. Além disso, uma resposta prolongada ou exacerbada Th2, tem potencial de indução de um quadro imunopatológico prejudicial.

Os helmintos, no que lhe concernem, induzem respostas regulatórias estratégicas a fim de suprimirem as respostas de proteção Th2 de seu hospedeiro e prevenir a imunopatologia deletéria para ambos. Para isso, eles induzem a hiporesponsividade das células T (Figura 3), melhorando a expressão das moléculas co-inibitórias nas células T, incluindo a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e a proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4). Os macrófagos M2 também podem regular as respostas das células T através da arginase. Já os MIs de helmintos, promovem a diferenciação das DC tolerogênicas que induzem preferencialmente a diferenciação das células Treg. E desta forma, as células Treg produzem as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β . Sendo assim, estas citocinas podem regular tanto

células Th2 antiparasitárias como células Th1/Th17 inflamatórias, que medeiam a imunopatologia (FINLAY *et al.*, 2014; MOTRAN *et al.*, 2018).

1.2.1 Imunomodulação do *Schistosoma mansoni*

O parasita do gênero *Schistosoma* já mostrou conseguir induzir alterações metabólicas em muitos tecidos envolvidos no metabolismo como o adiposo branco, hepático, músculo esquelético, pâncreas e o hipotálamo, além de apresentar função mediadora na imunorregulação que protege o hospedeiro contra o desenvolvimento do DM2 (HUSSAARTS *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2018). A prevalência de DM2 é de fato, consideravelmente, menor em pessoas com infecção prévia por *Schistosoma sp* do que em pessoas não portadoras do parasita (CHEN *et al.*, 2013). Apesar dessa interação benéfica entre o verme e o hospedeiro, se torna inviável a infecção de indivíduos de modo a melhorar o quadro clínico de uma doença como o DM2. Sendo assim, a identificação de moléculas ativas, como as proteínas, derivadas de helmínticos pode ser uma alternativa mais segura e eficaz para o tratamento de várias doenças em humanos.

Já se sabe que algumas proteínas do *Schistosoma sp* possuem a capacidade de alterar o sistema imune. O antígeno de membrana Sm29 presente nos vermes adultos, por exemplo, apresentou capacidade *in vitro* de aumentar a produção de IL-10 nos esplenócitos de camundongos vacinados com Sm29 e nas células sanguíneas mononucleares de indivíduos infectados por *S. mansoni* (CARDOSO *et al.*, 2008).

O peptídeo SJMHE1 do *S. japonicum*, por sua vez, suprimiu consideravelmente a inflamação das vias aéreas peribrônquicas, pela redução da infiltração de eosinófilos, induziu resposta de IgE e aumentou a resposta Th2 sobre a Th1, conseqüentemente, melhorando a resolução da asma, em modelo animal. Destacando a potencial eficácia da proteína no tratamento de outras doenças inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2019).

Já a proteína recombinante SmKI-1, inibidora de protease, foi capaz de se ligar à elastase e interferir na migração e função dos neutrófilos, reduzindo a inflamação de diferentes modelos murinos de doenças inflamatórias. No modelo de artrite por gota, a SmKI-1 reduziu o acúmulo de neutrófilos, a secreção de IL-1 β e o *score* patológico geral (MORAIS *et al.*, 2018).

Sendo assim, infecções parasitárias ou sub-partículas de helmintos, tem potencial de modificar a composição das células imunológicas no tecido adiposo, atenuando-se, assim, a inflamação e melhorando a tolerância à glicose. Essa proteção inclui desde a polarização de células imunes a macrófagos ativados alternativamente. Neste contexto, a imunomodulação por

produtos purificados ou sintéticos dos parasitos, veem sendo considerados possíveis ferramentas de inovação imunobiológica e tecnocientíficas.

Porém, uma vasta aplicação médica se limita devido aos efeitos adversos de uma infecção pelo *Schistosoma sp* e a potencial imunogenicidade de seus produtos. Nos últimos anos, algumas moléculas imunomoduladoras foram identificadas, como o LNFP III, capaz de induzir células β (especialmente células β -1) a secretar IL-10. LNFP III também foi relatado para, alternativamente, ativar macrófagos. Até o momento, a pesquisa sobre as respostas imunes protetoras mediadas por helmintos em modelos de diabetes tipo 1, foi restrita principalmente ao pâncreas e ao baço. Pesquisas recentes mostraram que a infecção por helmintos e produtos derivados de helmintos melhoram o metabolismo do fígado e tecido adiposo em modelos de camundongos com DM2 (SURENDAR *et al.*, 2016).

Sabendo-se, portanto, da importância do tecido adiposo e do hepatócito frente ao DM2, o papel da infecção helmíntica, nestes órgãos-alvo da insulina, se mantém em questionamento. Sendo assim, a avaliação de novos complexos terapêuticos propicia a busca de fármacos inovadores no tratamento e controle do DM2, desta forma, moléculas derivadas de helmintos tornam-se possíveis agentes terapêuticos imunomoduladores no tratamento de síndromes metabólicas.

1.3 PROTEÍNAS RECOMBINANTES DO *Schistosoma mansoni* ALVOS DO ESTUDO

1.3.1 Sm14

A proteína Sm14, pertencente à família das proteínas ligadoras de ácidos graxos intracelulares (FABPs), é um antígeno de 14 kDa com capacidade de se ligar aos ácidos palmítico e linolênico, atuando como captador, transportador e compartimentalizador de ácidos graxos derivados do organismo hospedeiro. Sua expressão se dá na lamela basal do tegumento e epitélio intestinal de cercárias, esquistossômulos e na fase adulta dos parasitas. Na literatura, é descrita sua capacidade protetora contra duas espécies de vermes parasitas, *S. mansoni* e *Fasciola hepatica*, além da propriedade de indução de respostas imunes humorais e a regulação de citocinas (RAMOS, *et al.*, 2009; RAMOS, 2002; BRITO *et al.*, 2002; LAM *et al.*, 2021; EYAYU, *et al.*, 2020; ABREU *et al.*, 2004; TENDLER and SIMPSON, 2008).

1.3.2 SmCyp

As ciclofilinas (Cyps) são proteínas extremamente conservadas da família das ubiquinonas. Conhecidas por possuir o domínio peptidil-prolil cis-trans isomerasas (PPIase), responsável pela conversão de ligações peptídicas contendo prolina de uma configuração *cis* para uma *trans*, sendo, importantes para a dobragem, transporte e montagem proteica corretas. As Cyps nas mais variadas espécies estão presentes em diferentes isoformas, abundância e distribuição em uma variedade de compartimentos celulares, no *Schistosoma mansoni* em específico, se encontram no tegumento, camadas musculares, epitélio intestinal e interior do verme, estando desta forma em contato direto com o sistema imunológico de seu hospedeiro (MELO *et al.*, 2019; BUGLI *et al.*, 1997; MELO, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de proteínas recombinantes do *Schistosoma mansoni*, na polarização de macrófagos e na atividade hepática *in vitro* na imunomodulação do DM2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Avaliar o efeito das proteínas recombinantes do *Schistosoma mansoni*, Sm14 e SmCyp, quanto a citotoxicidade, viabilidade, morfologia e produção de nitrito em macrófagos.

2.2.2 Avaliar a atuação das proteínas recombinantes do *S. mansoni*, Sm14 e SmCyp, na secreção de citocinas em macrófagos.

2.2.3 Compreender a função das proteínas recombinantes do *S. mansoni*, Sm14 e SmCyp, na polarização de macrófagos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES Sm14 e SmCyp DO *Schistosoma mansoni*

Todo o processo de produção de ambas as proteínas foi realizado pelo grupo de pesquisas de Biologia e Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto René Rachou- IRR (FIOCRUZ/MG), coordenado pela Profa. Dra. Cristina Toscano Fonseca.

Visando analisar a atividade imunomodulatória das proteínas Sm14 e SmCyp em modelos do DM2, foi realizada uma parceria entre o referido laboratório do IRR e o Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), coordenado pela Profa. Fernanda de Freitas Anibal.

3.2 EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS DO *Schistosoma mansoni*

As amostras congeladas dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Lizandra Guidi Magalhães Caldas, da Universidade de Franca (UNIFRAN). A extração das proteínas totais foi realizada empregando-se um tampão de extração contendo Tris-HCl, DTT, glicerol e inibidor de protease (SIGMA®). Na sequência, as amostras passaram por um ciclo de sonicação, 5 pulsos de 10 segundos cada, com 10 segundos de intervalo entre cada pulso e duas centrifugações com descarte dos *pellets*, a primeira com duração de 1 hora a 4 °C em 20800 rcf e a segunda, com duração de 30 minutos a 4 °C em 15000 rcf. Posteriormente, a quantificação do extrato proteico foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). E uma amostra de 10 µL foi coletada para a realização de uma corrida em gel de poliacrilamida a 15% em *SDS-PAGE* para constatar a pureza das amostras.

3.3 CULTIVO CELULAR

3.3.1 Cultivo de macrófagos J774.A1

Macrófagos imortalizados derivados de *Mus musculus* murino da linhagem J774A.1 do banco de células do LIDI, mantidos em nitrogênio líquido, foram descongelados e mantidas em garrafas médias de cultivo celular, empregando o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, SIGMA®) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Biotecnologia LGC) e os antibióticos penicilina e estreptomicina. Mantidos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, para os repiques celulares o uso de cell scraper foram empregados. Para todos os ensaios, foram estabelecidos protocolos em triplicatas independentes.

3.3.2 Cultivo de hepatócitos AML12

Hepatócitos imortalizados derivados de *Mus musculus* murinos da linhagem AML12 do banco celular do LIDI, mantidos em nitrogênio líquido, foram descongelados e condicionadas

em garrafas médias de cultivo celular, utilizando-se do meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Ham F12* (DMEM F12, SIGMA®). Suplementado com os antibióticos penicilina e estreptomicina, dexametasona, 10% de soro bovino fetal (SBF, Biotecnologia LGC), 0.005 mg/ml de Insulina, 0.005 mg/ml de Transferrina e 5 mg/ml de Selenium (ITS, SIGMA®) e mantidos em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para todos os ensaios, foram estabelecidos protocolos em triplicatas independentes.

3.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DO MTT

O protocolo para a análise do potencial da atividade mitocondrial dos macrófagos e hepatócitos frente ao tratamento com as proteínas recombinantes do *S. mansoni*, envolveu cultivar ambas as células em placa de 96 poços, em uma concentração de 10⁴ células por poço e após a adesão celular, submetê-las aos agentes testados, em diferentes concentrações e intervalos de tempo pré-determinados, 24 e 48 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e os poços lavados duas vezes com PBS 1x (solução salina tamponada) e adicionados 100 µL por poço da solução MTT a 0,5 mg/ml diluída em meio de cultivo sem SBF. As placas foram, então, incubadas protegidas da luz, por quatro horas a 37 °C e 5% de CO₂. Na sequência a solução reagente foi retirada e 100 µL do diluente dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado por poço, seguido da leitura da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro (*Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*) (MAGALHÃES *et al.*, 2018; FRAGELLI *et al.*, 2021).

O delineamento experimental envolveu o teste de cinco concentrações para cada uma das duas proteínas recombinantes, Sm14 e SmCyp, sendo elas 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL, uma concentração (25 µg/mL) para a proteína total do *Schistosoma mansoni* e um controle negativo, ao qual não foi aplicado nenhum tratamento às células, além do meio de cultivo.

Tais concentrações, foram pré-determinadas mediante um ensaio de MTT piloto, onde foram testadas as proteínas totais (PT) e Sm14 nas concentrações seriadas de 400 a 25 µg/mL e dois controles, um sendo a célula sem qualquer tratamento e outro tratado com LPS, a 1 µg/mL.

A percentagem de viabilidade obtida do ensaio MTT foi calculada pela divisão da média (Me) da absorbâncias do grupo experimental pela Me do grupo controle, descontando-se sempre a Me do branco de cada um dos grupos, e multiplicando por cem, conforme a equação:

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{\text{Me grupo experimental} - \text{Me branco} \times 100}{\text{Me grupo controle} - \text{Me branco}}$$

3.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DA CAPTAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO (VN)

A fim de avaliar a atividade lisossomal dos macrófagos e hepatócitos, o protocolo envolveu os mesmos procedimentos do MTT, com cultivo celular em placa de 96 poços, na concentração de 10^4 células por poço e submissão dos compostos em diferentes concentrações nos intervalos de 24 e 48 horas, após a adesão celular.

Na sequência, os sobrenadantes foram coletados e os poços lavados duas vezes com PBS 1x e 100 μL por poço da solução a 30 $\mu\text{g/ml}$ de VN eluída em meio de cultivo sem SBF, foram adicionados. A placa foi incubada, protegida da luz, por duas horas a 37°C e 5% de CO_2 . Na sequência, a solução reagente foi retirada e 200 μL da solução 1:1 de etanol (50%) e ácido acético (1%) foi adicionado por poço, seguido da leitura da absorvância a 540 nm em um espectrofotômetro (*Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*) (ATES *et al.* 2017).

O delineamento experimental aqui foi o mesmo proposto para o MTT, com as mesmas cinco concentrações seriadas para cada uma das duas proteínas recombinantes (Sm14 e SmCyp), uma concentração para a proteína total do *S. mansoni* e um controle negativo, grupo não tratado.

A percentagem de viabilidade obtida do ensaio de captação do VN foi calculada utilizando-se a mesma equação empregada no ensaio do MTT.

3.6 MORFOLOGIA CELULAR

Para analisar as características morfológicas dos macrófagos e hepatócitos, ambas as células foram cultivadas em placas de 96 poços, a uma concentração de 10^4 células por poço.

Transcorridas 24 horas para a adesão celular, os tratamentos foram aplicados e os períodos de exposição às proteínas recombinantes, obedecidos. Os poços foram lavados com PBS 1x e as morfologias celulares observadas em microscópio óptico *Axiocvert 40 CFL* (Zeiss), cujas imagens foram capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio, modelo LOD-3000 (*Bio Focus*) e analisadas pelo *software Future WinJoe TM version 2.0*.

3.7 POLARIZAÇÃO DE MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A fim de avaliar o efeito imunomodulatório das proteínas do *S. mansoni*, o protocolo de polarização de macrófagos e o tratamento com as proteínas foram estabelecidos da seguinte maneira.

As células J774.A1 foram cultivadas em placas de 12 poços, em uma concentração de 10^5 células por poço e mantidas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂ em uma incubadora umidificada. Foi estabelecido como controle experimental, um grupo M0 (células não tratadas), um grupo para indução de perfil M1 e outro para perfil M2.

Para avaliar a atividade imunomodulatória das proteínas, foram estabelecidos quatro grupos experimentais com a maior concentração empregada nos ensaios anteriores (400 µg/ml para as recombinantes e 25 µg/ml para as proteínas totais). Sendo o primeiro grupo, tratado com as proteínas totais, o segundo com a Sm14, o terceiro com a SmCyp e o quarto grupo, tratado com a combinação das duas proteínas, Sm14 e SmCyp.

O delineamento experimental, ocorreu da seguinte maneira:

- **M0:** macrófagos cultivados apenas em meio DMEM
- **M1:** macrófagos tratados com LPS (1 µg/mL) + INF- γ humano (0,01 µg/mL)
- **M2:** macrófagos tratados com IL-10 (0,01 µg/mL) + dexametasona ($3,2 \times 10^{-5}$ µg/mL)
- **PT:** macrófagos tratados com o extrato proteico do *S. mansoni* a 25 µg/mL
- **Sm14 [400]:** macrófagos tratados com a proteína recombinante Sm14 a 400 µg/mL
- **SmCyp [400]:** macrófagos tratados com a proteína recombinante SmCyp a 400 µg/mL
- **Sm14+Cyp [400]:** macrófagos tratados com a combinação das proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp a 400 µg/mL

Os tratamentos foram mantidos por 24 horas, na sequência os sobrenadantes foram coletados e acondicionados em -80 °C para as análises de marcadores inflamatórios por ELISA e detecção de espécies reativas de nitrogênio.

Após a coleta dos sobrenadantes, foram adicionados 1 mL por poço da solução tampão PBS 1x, as placas foram então centrifugadas a 1500 rpm por 10 min, os sobrenadantes descartados e adicionados mais 1 mL por poço da solução PBS 1x. As placas foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes descartados.

Adicionou-se 200 μL de tampão FACS (PBS 1x e SBF a 2%) com os anticorpos de interesse (anti-CD80 conjugado ao fluorocromo FITC e anti-CD206 conjugado ao fluorocromo PE), seguida da incubação por 30 min ao abrigo da luz. Na sequência, centrifugou-se as placas por 10 min a 1500 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 300 μL de tampão FACS. Os poços, então, foram raspados com o auxílio do *scraper* e o conteúdo recolhido em tubos para leitura, realizada em um citômetro de fluxo *Accuri™ C6 BD Biosciences*, selecionando um *gate* com 20.000 eventos, sendo as análises realizadas com o auxílio do *software FlowJo™ version X (BD Biosciences)*.

3.8 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DA REACÇÃO DE Griess

3.8.1 Macrófagos J774.A1

Para aferir a concentração de nitrito produzido pelos macrófagos frente aos tratamentos, o protocolo experimental envolveu aliquotar 50 μL , em placas de 96 poços, os sobrenadantes obtidos do MTT e da polarização de macrófagos. Na sequência, foram adicionados no escuro 50 μL da solução de *Griess* (mistura 1:1 da solução A [1% sulfanilamida em ácido fosfórico a 5%] e solução B [0,1% dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina]), na sequência a placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz, seguida da leitura da absorvância em 540 nm em espectrofotômetro (*Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*) (FRAGELLI *et al.*, 2021).

3.9 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS POR ELISA

Para a quantificação das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α (*Kit OptEIA™, BD Biosciences*) o ensaio ELISA direto foi empregado utilizando-se as amostras coletadas do MTT e polarização de macrófagos, conforme o seguinte protocolo.

As placas de microtitulação de alta afinidade de 96 poços, foram inicialmente sensibilizadas com 100 μL /poço da solução contendo o anticorpo monoclonal anti-citocina (anticorpo de captura) em tampão de diluição específico, e incubadas *overnight* (~12 horas) a 4 °C.

Após este período as placas foram lavadas, por três vezes, com 300 μL /poço da solução de lavagem (PBS 1x + *Tween20* 0,05%). Na sequência, foram adicionados 200 μL /poço da

solução de bloqueio (PBS 1x + BSA 1%) e as placas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente. Então, foram lavadas por mais três vezes com 300 µL/poço da solução de lavagem.

Logo após, foram construídas as curvas para cada citocina, obedecendo-se as informações fornecidas pelo fabricante, e aliqüotados 100 µL/poço das amostras (sobrenadantes do MTT e polarização) e branco, todos em triplicata. As placas foram incubadas por mais duas horas à 4 °C.

Transcorridos esse intervalo, as placas foram novamente lavadas por três vezes, com a solução de lavagem. Ao abrigo de luz, o anticorpo secundário e a enzima de detecção foram preparadas, diluindo-os em PBS 1x + BSA 1% na proporção recomendada pelos respectivos kits e aplicados 100 µL/poço, seguida da incubação das placas por uma hora e meia ao abrigo da luz, em temperatura ambiente.

As placas foram lavadas, novamente, por três vezes com a solução de lavagem. E ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB foi adicionado, seguido da incubação no escuro das placas, pelo tempo de 10 a 20 minutos, aproximadamente.

Após a mudança de coloração, a reação foi bloqueada com a adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N, e a leitura das absorbâncias a 450 nm realizada em espectrofotômetro (*Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer*), sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/mL.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados utilizando *GraphPad Prism 7.0* (San Diego, Califórnia, EUA). A identificação dos dados discrepantes foi realizada por meio da análise de *Grubbs*, seguida da distribuição das variáveis testadas pela normalidade (teste de *Shapiro-Wilk*) para verificar a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados. Para tanto, foi aplicado o teste ANOVA (análise de variância) aos dados paramétricos e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, sendo os resultados apresentados em média e desvio padrão. Para os dados não paramétricos, utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis* e o pós-teste de comparação múltipla de *Dunn*, sendo os resultados apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTES DE AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIOS DO MTT E VN

O ensaio colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] para a determinação de citotoxicidade é muito difundido, devido a sua sensibilidade de detecção, dado que quantifica o dano induzido pelo agente testado, no metabolismo celular de glicídeos, pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Neste teste, pequenas alterações na atividade metabólica podem gerar grandes alterações no MTT, permitindo detectar o estresse celular após a exposição a um agente na ausência de morte celular direta (MAGALHÃES *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018).

Sendo assim, a viabilidade mitocondrial, e por consequência, a viabilidade celular, pode ser estimada pela redução do sal amarelo MTT, solúvel em água, a um cristal formazan roxo, insolúvel, pela atividade das enzimas, sendo essa redução, diretamente proporcional a atividade mitocondrial e à viabilidade celular (MAGALHÃES *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018).

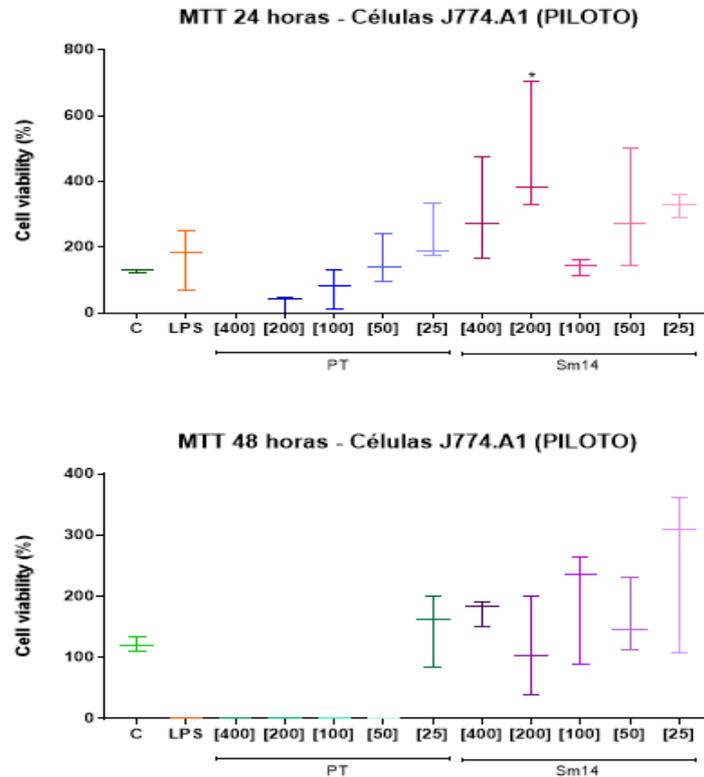
Já o ensaio do vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina) quantifica a viabilidade celular baseada na capacidade das células vivas de incorporar e se ligar ao vermelho neutro (VN). O teste parte do princípio de que o fraco corante catiônico eurodico penetra as células por difusão não iônica em pH fisiológico, o VN acumula-se nos lisossomas celulares, onde um gradiente de prótons assegura um pH mais ácido tornando o corante carregado. O agente testado pode ou não gerar alterações na superfície celular, ou na membrana lisossomal, neste último cenário as enzimas digestivas lisossomais acabam sendo liberadas no citosol, levando a morte celular e diminuindo a ligação ao VN. Sendo assim, o ensaio permite avaliar a permeabilidade da membrana e a atividade lisossômica, diferenciando-se então células viáveis de danificadas ou mortas (ATES *et al.*, 2017; SIQUEIRA, 2016).

4.1.1 Ensaio MTT piloto para os delineamentos experimentais subsequentes

A partir do ensaio piloto foi possível gerar os gráficos da Figura 4. Onde a proteína recombinante Sm14 e o extrato proteico (PT), juntamente, dos controles celular e LPS, foram testados a fim de avaliar o melhor espectro de atividade de ambas as proteínas, nas células de macrófagos no intervalo de 24 e 48 horas. E assim estabelecer os delineamentos experimentais subsequentes. Ademais, as concentrações seriadas escolhidas, foram determinadas a partir de

uma busca literária de trabalhos envolvendo proteínas e enzimas recombinantes de diversos parasitas helmínticos na elaboração de vacinas e demais fármacos e/ou tratamentos.

Figura 4: Ensaio piloto de viabilidade celular



Análise piloto da viabilidade dos macrófagos murinos ao tratamento com a proteína recombinante Sm14 e extrato proteico (proteínas totais - PT), com seus controles, celular (C) e LPS, nos intervalos de 24 e 48 horas. O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos tratados quando comparados ao controle (C).

Pela análise da Figura 4, foi possível afirmar que a Sm14 quando comparada ao controle celular, apresentou menor citotoxicidade e conseqüentemente maior viabilidade celular, em ambos os intervalos de tempo. Já as proteínas totais do *S. mansoni*, apresentaram um perfil mais citotóxico aos macrófagos, atividade ainda mais evidenciada no intervalo de 48 horas, desta forma, para os demais ensaios determinou-se o uso de sua menor concentração (25 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, os resultados obtidos com o controle negativo LPS quando comparado ao controle celular, demonstraram que na concentração empregada (1 $\mu\text{g/mL}$), o mesmo não foi suficiente para a ativação celular no intervalo de 48 horas, acarretando uma menor viabilidade das células neste período. Nos demais testes de viabilidade, este controle não foi empregado, uma vez que

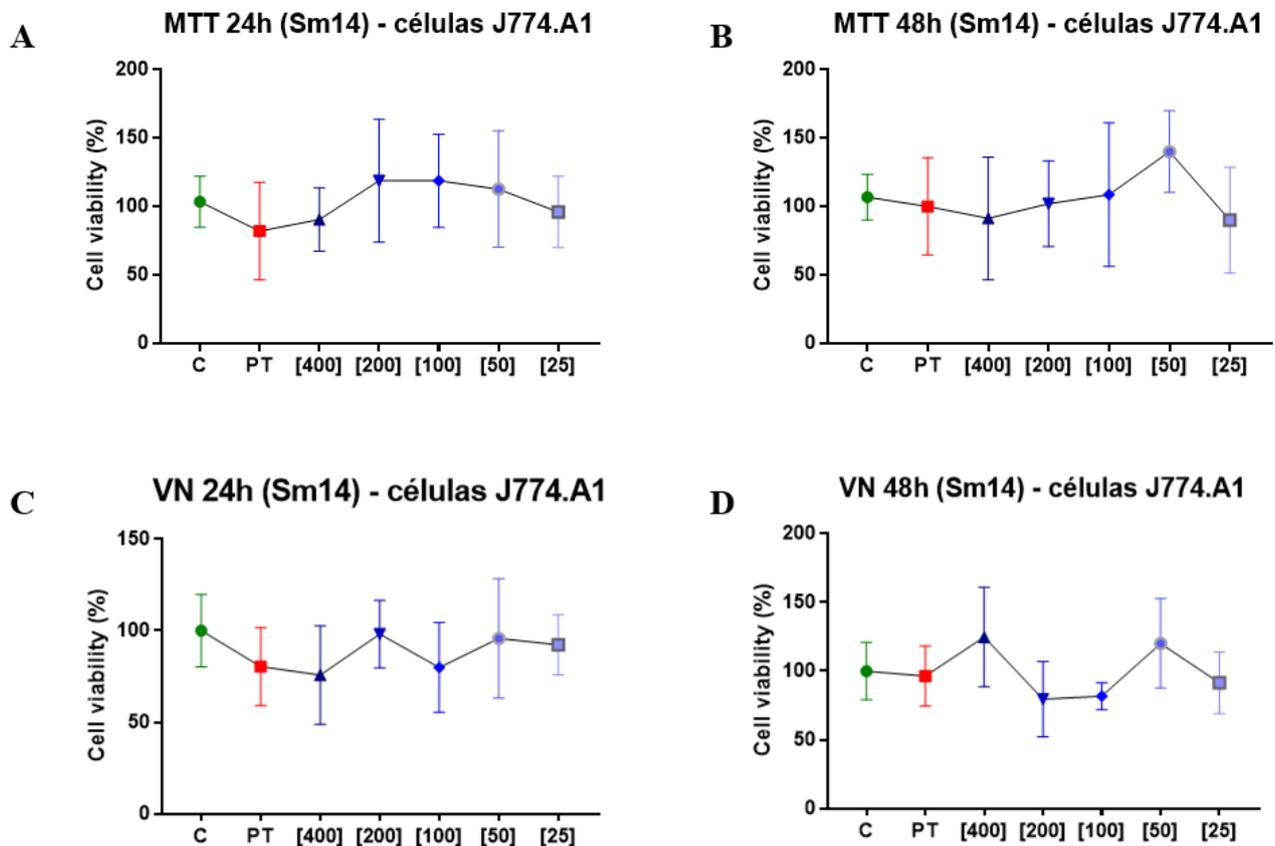
a concentração usada no piloto é a máxima permitida para ensaios na concentração celular necessária para placas de 96 poços.

Em suma, a partir da resposta celular frente a Sm14 e PT nos intervalos de tempo de 24 e 48 horas, para os testes seguintes foram empregados as mesmas concentrações seriadas para ambas as proteínas recombinantes (Sm14 e SmCyp) e a menor concentração do piloto para a PT (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e um controle celular não tratado.

4.1.2 Ensaios de viabilidade celular de macrófagos J774.A1 com a proteína Sm14

Ensaios independentes foram realizados para a plotagem dos gráficos, apresentados na Figura 5.

Figura 5: Viabilidade das células de macrófagos J774.A1 ao tratamento com a proteína recombinante Sm14



Análises das viabilidades dos macrófagos murinos aos tratamentos com a proteína recombinante Sm14 nas concentrações seriadas de 400 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e extrato proteico (proteínas totais - PT) a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e seus controles

negativos (C), nos intervalos de 24 e 48 horas. **A.** MTT de 24 horas **B.** MTT de 48 horas **C.** VN 24 horas **D.** VN 48 horas.

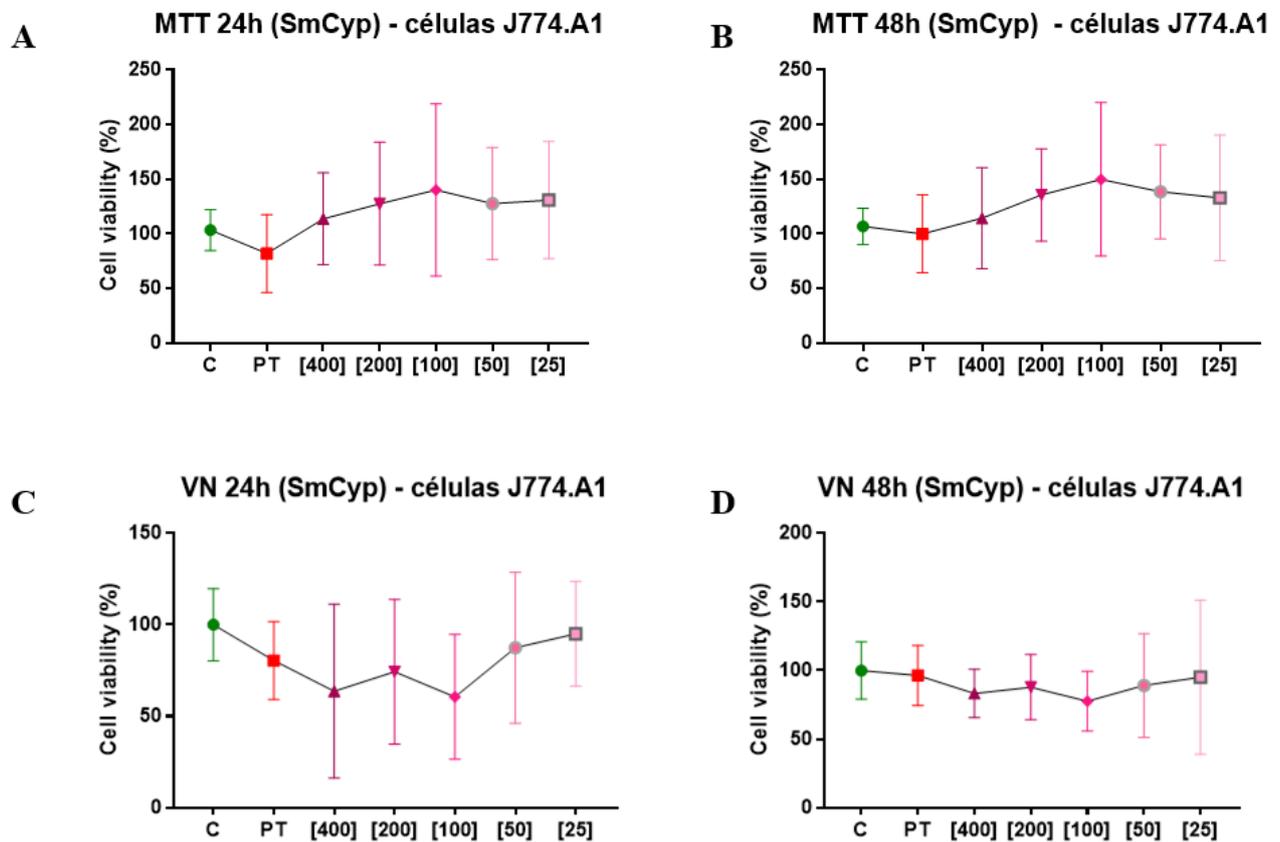
Os tratamentos com a proteína recombinante Sm14 aumentaram a viabilidade de macrófagos murinos, comparado ao grupo não tratado denominado, controle celular (C). É possível observar ainda um estado celular compensatório em função do tempo de exposição a proteína recombinante, com aumento da viabilidade em 48 horas. O mesmo se observa quanto ao tratamento com as proteínas totais.

Sendo assim, a Sm14 e PT, nas concentrações e intervalos de tempo empregados, apresentaram baixa citotoxicidade, considerada atividade mitocondrial e integridade da membrana e lisossoma dos macrófagos J774.A1.

4.1.3 Ensaio de viabilidade celular de macrófagos J774.A1 com a proteína SmCyp

Mediante ensaios independentes, foram realizados a plotagem dos gráficos, apresentados na Figura 6.

Figura 6: Viabilidade das células de macrófagos J774.A1 ao tratamento com a proteína recombinante SmCyp



Análises das viabilidades dos macrófagos murinos aos tratamentos com a proteína recombinante SmCyp nas concentrações seriadas de 400 a 25 $\mu\text{g/mL}$ e extrato proteico (proteínas totais - PT) a 25 $\mu\text{g/mL}$, e seus controles negativos (C), nos intervalos de 24 e 48 horas. **A.** MTT de 24 horas **B.** MTT de 48 horas **C.** VN 24 horas **D.** VN 48 horas.

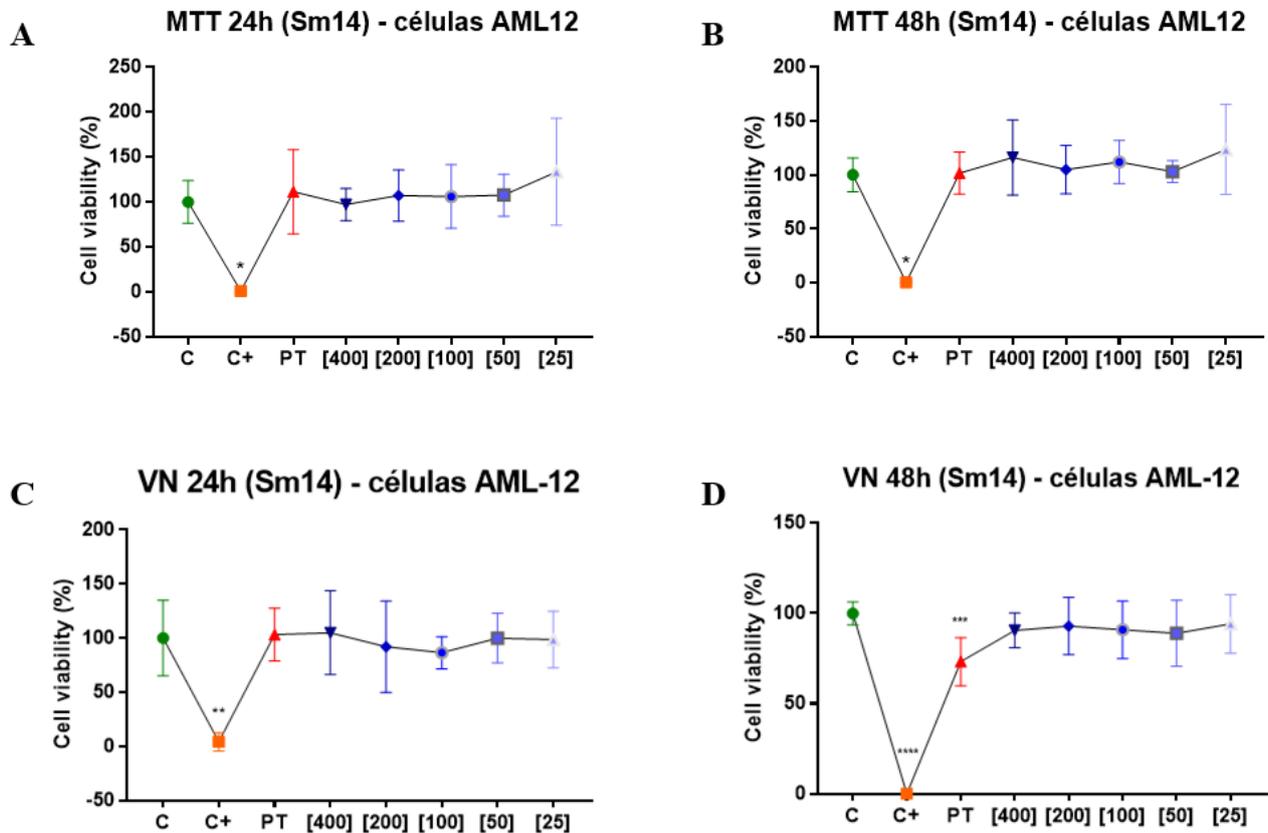
Observa-se que os tratamentos com a proteína SmCyp apresentaram maior viabilidade às células de macrófago murino, comparado ao grupo controle celular. Assim como com a Sm14, a SmCyp também manifestou um estado celular compensatório em função do tempo de exposição a proteína, com aumento da viabilidade dos macrófagos em 48 horas. Fenômeno igualmente apresentado pelo extrato proteico.

Portanto, a SmCyp e PT, nas concentrações e intervalos de tempo empregados, apresentaram baixa citotoxicidade, e conseqüentemente, elevada viabilidade, considerada atividade mitocondrial e integridade lisossomal e membranas dos macrófagos J774.A1.

4.1.4 Ensaios de viabilidade celular de hepatócitos AML 12 com a proteína Sm14

Foram conduzidos ensaios independentes para a elaboração dos gráficos, os quais são exibidos na Figura 7.

Figura 7: Viabilidade das células de hepatócitos AML 12 ao tratamento com a proteína recombinante Sm14



Análises das viabilidades dos hepatócitos murinos aos tratamentos com a proteína recombinante Sm14 nas concentrações seriadas de 400 a 25 $\mu\text{g/mL}$ e extrato proteico (proteínas totais - PT) a 25 $\mu\text{g/mL}$, e seus controles negativos (C) e controles positivos extran (C+), nos intervalos de 24 e 48 horas. **A.** MTT de 24 horas **B.** MTT de 48 horas **C.** VN 24 horas **D.** VN 48 horas. O símbolo * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e **** ($p < 0,0001$) representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos tratados quando comparados ao controle (C).

O tratamento com a proteína recombinante Sm14 demonstrou aumentar a viabilidade dos hepatócitos murinos em comparação com o grupo não tratado (C), principalmente em 48 horas de exposição ao tratamento.

Em outras palavras, foi possível observar, assim como nos macrófagos, a mesma atividade celular de compensação em função do tempo de exposição à proteína recombinante,

com um aumento significativo da viabilidade em 48 horas. Essa tendência é similar ao observado com o tratamento utilizando as proteínas totais.

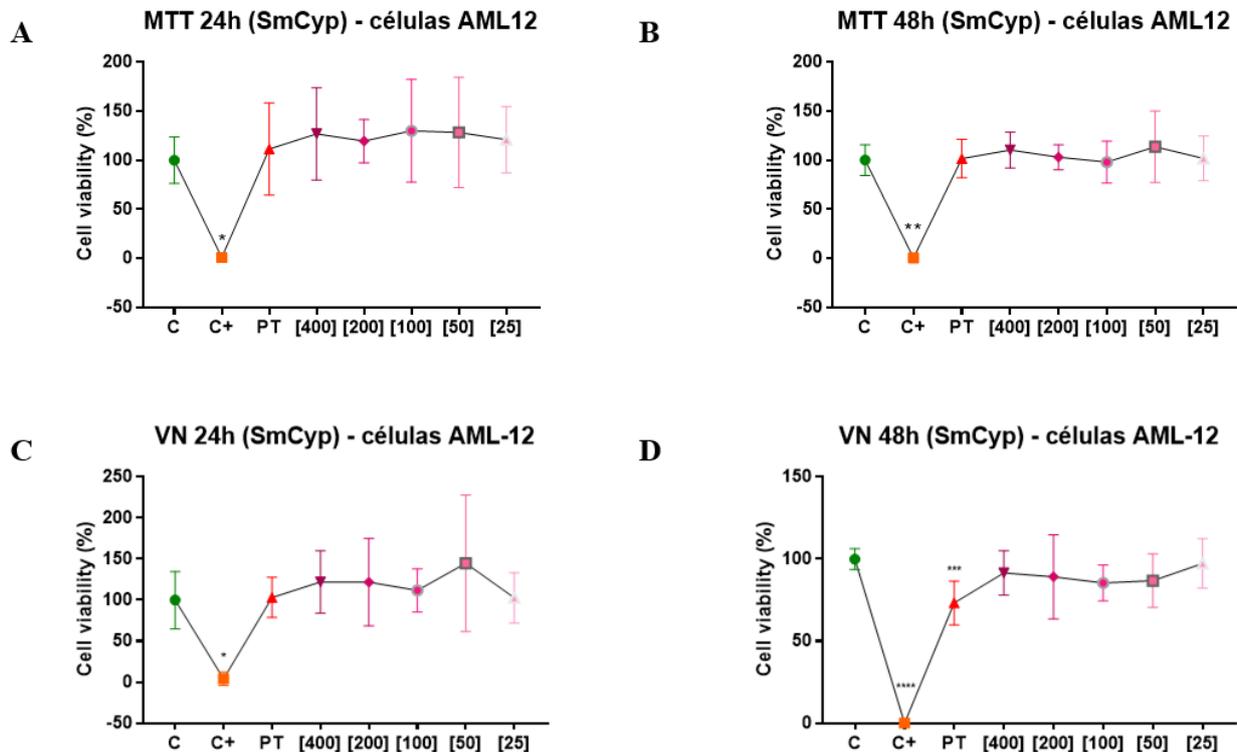
Conforme esperado, o grupo controle positivo (Extran) (C+) demonstrou inviabilidade celular em ambos os períodos de teste.

Assim, tanto a Sm14 quanto a PT, nas concentrações e intervalos de tempo testados, mostraram baixa citotoxicidade e, conseqüentemente, alta viabilidade celular, refletida na atividade mitocondrial e na integridade lisossomal e membranas dos hepatócitos AML 12.

4.1.5 Ensaio de viabilidade celular de hepatócitos AML 12 com a proteína SmCyp

Os gráficos apresentados na Figura 8 foram plotados com base em ensaios independentes realizados.

Figura 8: Viabilidade das células de hepatócitos AML 12 ao tratamento com a proteína recombinante SmCyp



Análises das viabilidades dos hepatócitos murinos aos tratamentos com a proteína recombinante SmCyp nas concentrações seriadas de 400 a 25 µg/mL e extrato proteico (proteínas totais - PT) a 25 µg/mL, e seus controles negativos (C) e controles positivos extran (C+), nos intervalos de 24 e 48 horas. **A.** MTT de 24 horas **B.** MTT de 48 horas **C.** VN 24 horas **D.** VN 48 horas. O símbolo * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e **** ($p < 0,0001$) representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos tratados quando comparados ao controle (C).

O tratamento com a proteína recombinante SmCyp apresentou um comportamento semelhante à proteína anterior, resultando no aumento na viabilidade dos hepatócitos murinos em comparação com o grupo controle não tratado (C), especialmente após 48 horas de exposição ao tratamento.

E similarmente aos resultados observados nos macrófagos com ambas as proteínas e nos hepatócitos com a Sm14, foi evidenciada uma resposta de compensação celular em relação ao tempo de exposição à SmCyp, com aumento significativo na viabilidade após 48 horas. Esta tendência é consistente com os resultados obtidos com o tratamento utilizando as proteínas totais.

Como esperado, o grupo controle positivo (Extran) (C+) apresentou inviabilidade celular em ambos os períodos testados.

Dessa forma, tanto a SmCyp quanto a PT, nas concentrações e intervalos de tempo investigados, demonstraram baixa citotoxicidade e, conseqüentemente, alta viabilidade celular.

Isso se reflete na preservação da atividade mitocondrial e na integridade lisossomal e membranas dos hepatócitos AML 12.

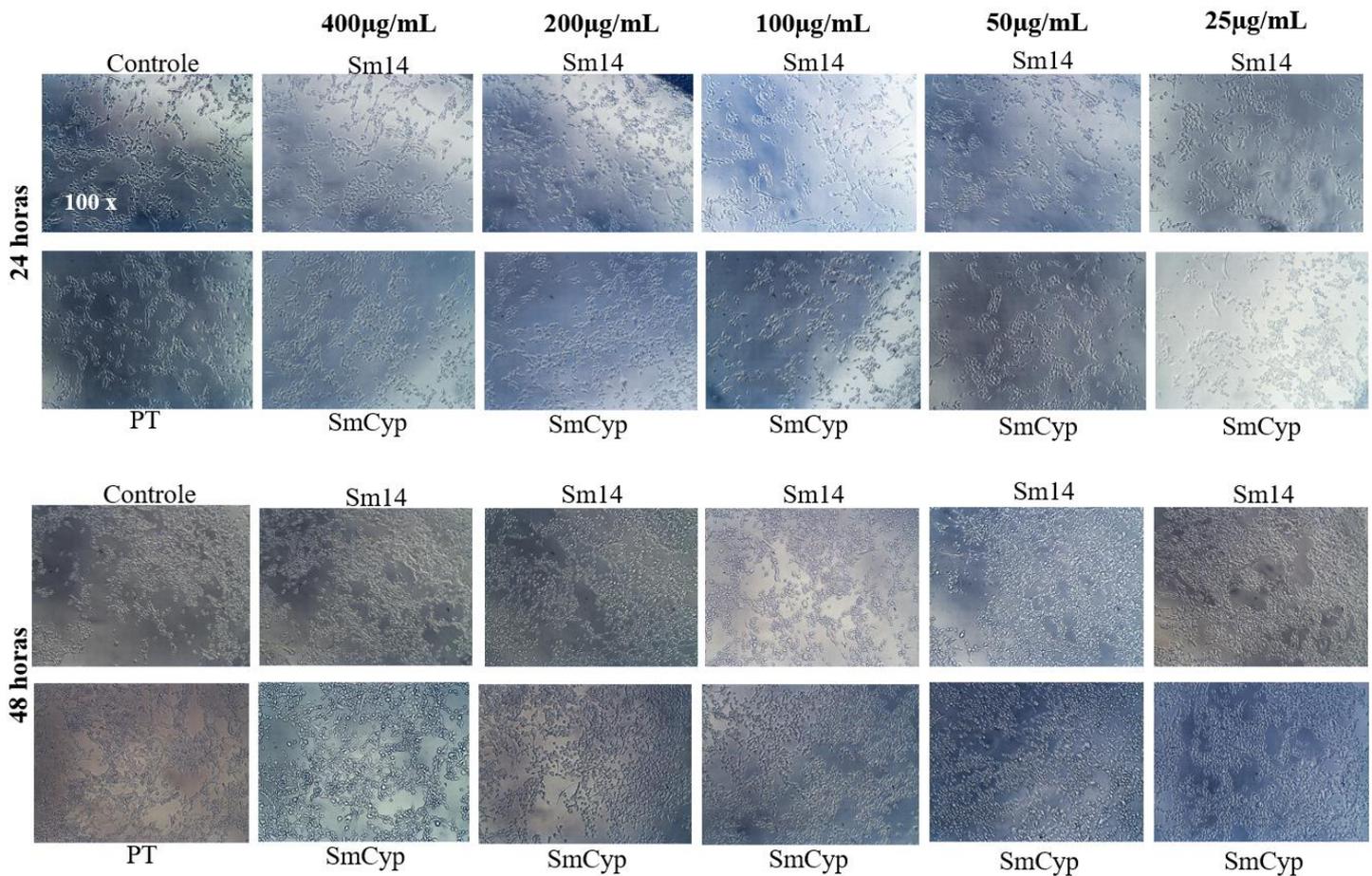
As avaliações do potencial de citotoxicidade das proteínas Sm14, SmCyp e extrato proteico, nas células de macrófagos e hepatócitos deste trabalho, apresentaram comportamento equivalente a estudos antecessores, realizados por Moraes e Silva, com a proteína SmKI-1, inibidor de serino proteases do tipo Kunitz. Nos estudos citados, células BHK-21 foram submetidas a diferentes concentrações da SmKI-1, com o intuito de avaliar seu potencial vacinal contra a esquistossomose e como molécula promissora na terapia de doenças inflamatórias. A referida proteína recombinante, somente se mostrou citotóxica a partir da concentração de 1000 µg/mL, e em concentrações inferiores, apresentou comportamento proliferativo celular, comparado ao grupo controle negativo pelo ensaio colorimétrico MTS (MORAIS, S. B, 2018; SILVA, F. M, 2020).

4.2 ANÁLISES DAS MORFOLOGIAS CELULARES

4.2.1 Macrófagos J774.A1

Com base nas imagens dos macrófagos tratados com as proteínas recombinantes durante os intervalos de 24 e 48 horas, a Figura 9 foi gerada.

Figura 9: Análise morfológica dos macrófagos da linhagem J774.A1 frente aos tratamentos com as proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp em 24 e 48 horas



Análises da morfologia dos macrófagos murinos, aumentados em 100 vezes, aos tratamentos com as proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp nas concentrações seriadas de 400 a 25 µg/mL e extrato proteico (proteínas totais - PT) a 25 µg/mL, e seus controles negativos (Controle), nos intervalos de 24 e 48 horas. Imagens geradas em microscópio óptico e analisadas pelo software *Future WinJoe TM version 2.0*.

As imagens geradas corroboram com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular, que detectaram aumento da viabilidade dos macrófagos frente ao tratamento com as duas proteínas recombinantes, comparadas ao grupo controle.

Nota-se ainda, que além do aumento do número de células com os diferentes tratamentos, não houve mudança significativa na forma dos macrófagos, se comparados ao grupo controle. Mostrando-se, portanto, que as células não responderam com estímulos lesivos através dos extensos processos adaptativos celulares para com as proteínas recombinantes e extrato proteico.

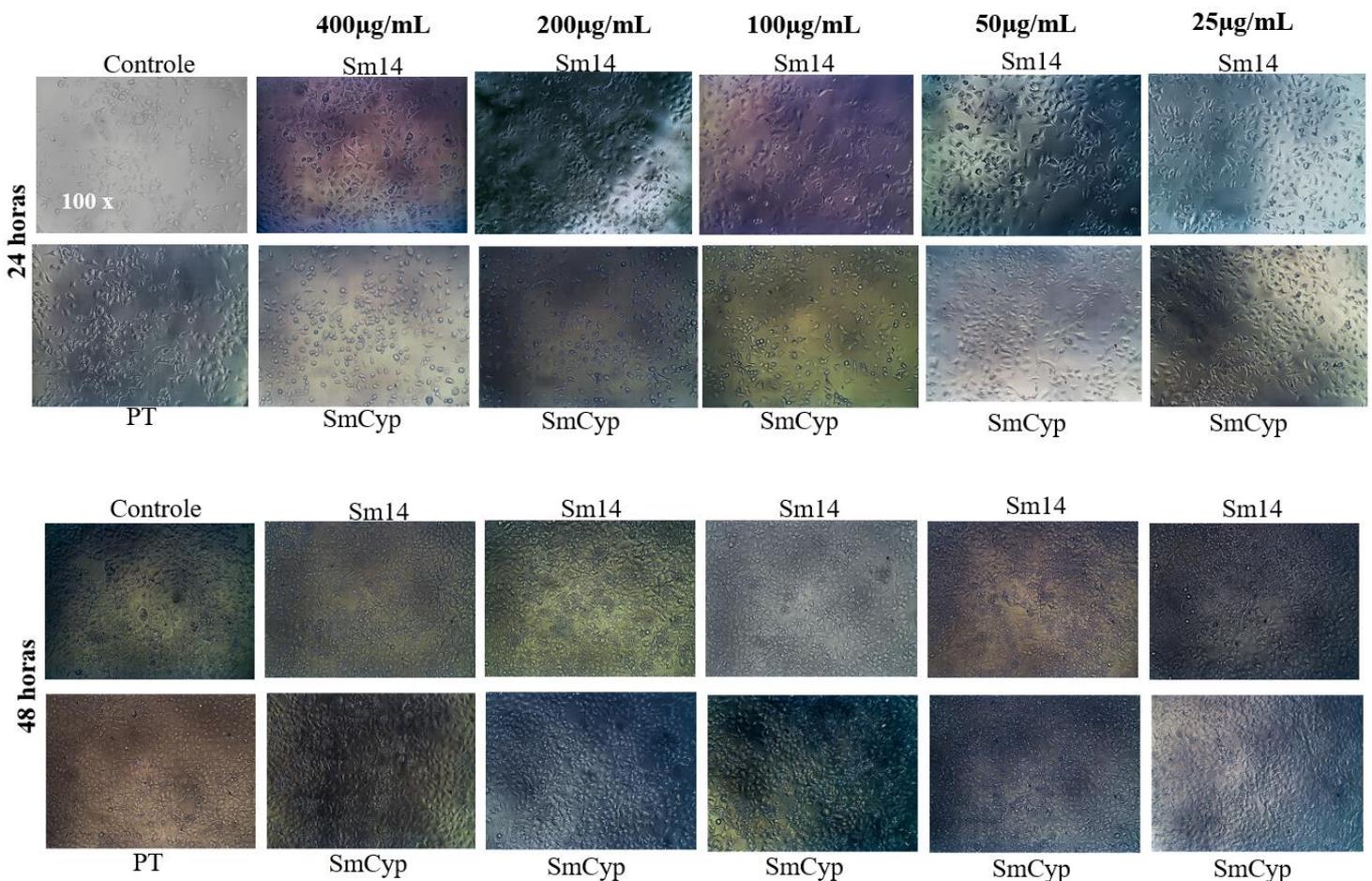
Além disso, no intervalo de 48 horas é possível verificar um aumento considerável da monocamada celular, isto é, observou-se uma alteração no padrão de crescimento celular

(hiperplasia), principalmente, nas concentrações mais baixas de ambas as proteínas, reforçando-se assim que os ensaios subsequentes de polarização de macrófagos, devam ser realizados no período de 24 horas, de modo a diminuir a inibição por contato e consequente morte celular.

4.2.2 Hepatócitos AML 12

Assim como com a linhagem anterior, por meio das imagens capturadas das células de hepatócitos tratados com as proteínas recombinantes nos intervalos de 24 e 48 horas, gerou-se a Figura 10.

Figura 10: Análise morfológica dos hepatócitos da linhagem AML 12 frente aos tratamentos com as proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp em 24 e 48 horas



Análises da morfologia dos hepatócitos murinos, aumentados em 100 vezes, aos tratamentos com as proteínas recombinantes Sm14 e SmCyp nas concentrações seriadas de 400 a 25 µg/mL e extrato proteico (proteínas totais - PT) a 25 µg/mL, e seus controles negativos (Controle), nos intervalos de 24 e 48 horas. Imagens geradas em microscópio óptico e analisadas pelo software *Future WinJoe TM version 2.0*.

As imagens obtidas reforçam os resultados de aumento da viabilidade celular observados nos ensaios de MTT e VN. Além do aumento da monocamada celular nos dois intervalos de tempo e para ambas as proteínas (Sm14 e SmCyp), não houve mudança significativa na forma dos hepatócitos, se comparados ao grupo controle.

Portanto, evidenciou-se que as células não reagiram a estímulos danosos por meio de elaborados processos adaptativos frente as proteínas recombinantes e PT.

Assim, como com os macrófagos, aqui no intervalo de 48 horas houve uma alteração no padrão de crescimento celular (hiperplasia), em todas as concentrações e para ambas as proteínas, observando-se ainda em alguns poços, células suspensas resultantes da inibição por contato e consequente morte celular. Favorecendo-se a padronização dos ensaios no intervalo de 24 horas.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Os gráficos *Dot Plots* apresentados na Figura 11 foram gerados a partir da leitura do ensaio de polarização por citometria de fluxo.

Figura 11: Ensaio de polarização de macrófagos e imunomodulação de proteínas recombinantes do *Schistosoma mansoni* por citometria de fluxo.

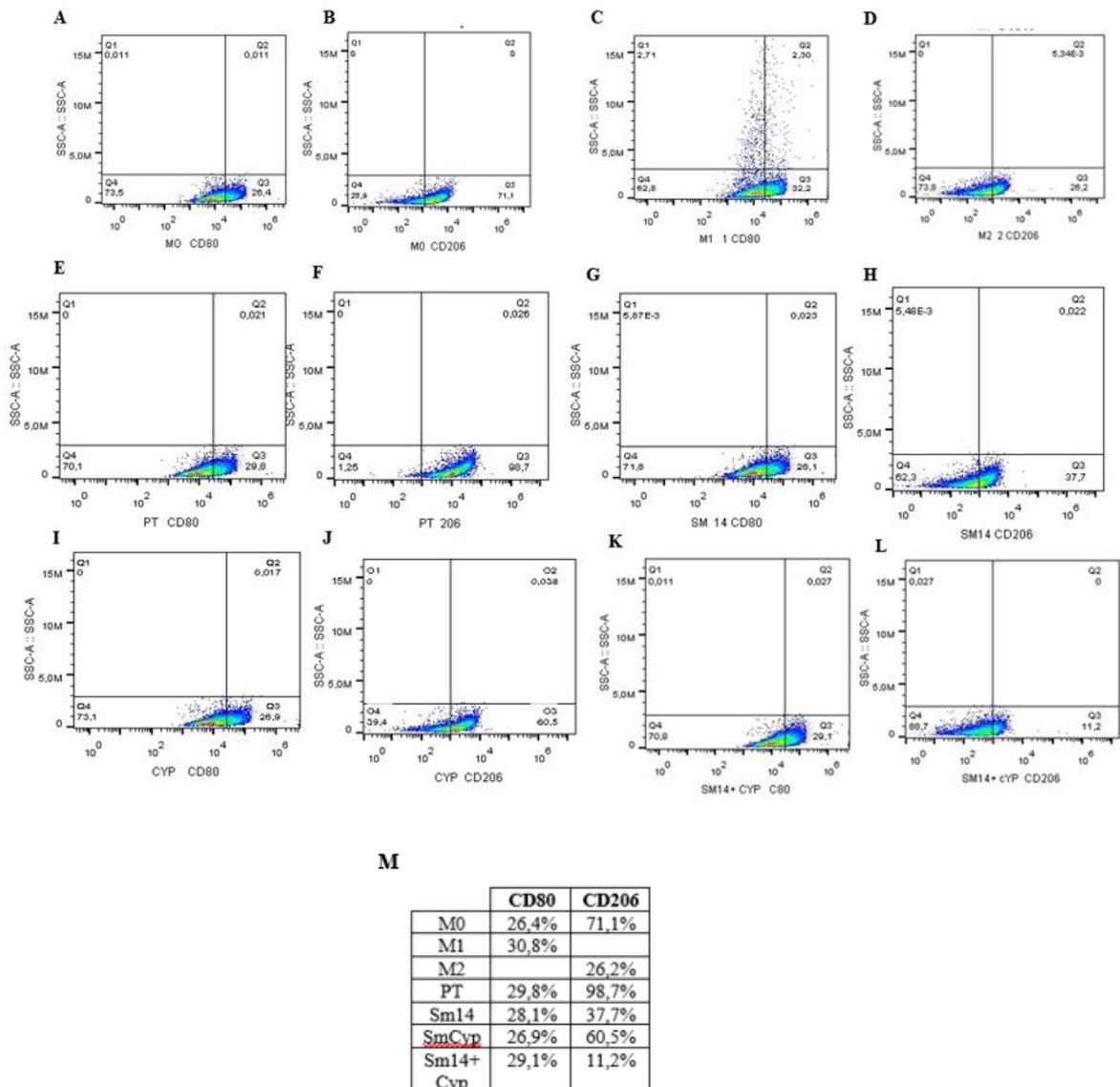


Gráfico *Dot Plot* da análise simultânea da potencialidade de expressão de receptores CD80 e CD206. **A.** Grupo controle M0 (não tratado) marcado com CD80 **B.** Grupo controle M0 (não tratado) marcado com CD206 **C.** Grupo M1, marcado com CD80 **D.** Grupo M2, marcado com CD206 **E.** Grupo PT marcado com CD80 **F.** Grupo PT marcado com CD206. **G.** Grupo Sm14 marcado com CD80. **H.** Grupo Sm14 marcado com CD206 **I.** Grupo SmCyp marcado com CD80 **J.** Grupo SmCyp marcado com CD206. **K.** Grupo Sm14 + Cyp marcado com CD80 **L.** Grupo Sm14 + Cyp marcado com CD206. **M.** Percentual da potencialidade de expressão de cada receptor por tratamento.

Os anticorpos de interesse, anti-CD80 conjugado ao fluorocromo FITC e anti-CD206 conjugado ao fluorocromo PE, estão associados ao perfil de polarização de macrófagos M1 e M2, respectivamente.

Sendo assim, os resultados demonstraram, através do *Dot Plot*, que as células de macrófago murino da linhagem J774.A1 apresentaram um potencial perfil de polarização ao serem tratadas com as proteínas recombinantes e totais do *Schistosoma mansoni* quando comparadas ao controle M0.

No caso, o grupo tratado com as proteínas totais (PT) nas condições empregadas, apresentaram um potencial de polarização para perfil M2 de macrófagos (CD206) quando comparado ao controle M0, a mesma potencialidade foi observada, com o grupo tratado com a proteína SmCyp.

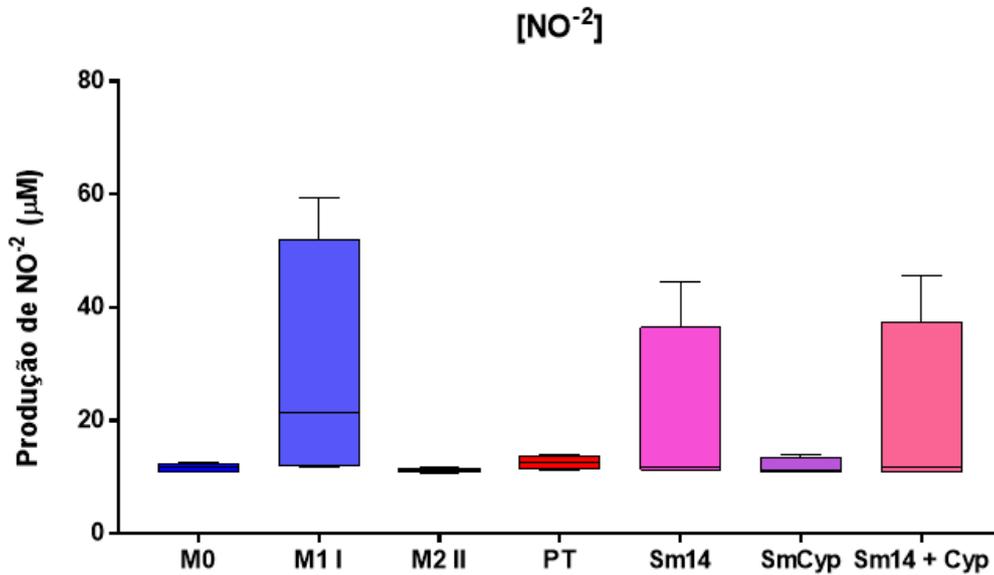
Já as células tratadas com a Sm14, quando comparado ao controle, apresentou uma tendência para perfil intermediário de polarização M1/M2, uma vez que os valores percentuais obtidos são bem próximos nas expressões de CD80 e CD86. Enquanto, o grupo tratado com a junção das proteínas, Sm14+Cyp, nas condições empregadas, apresentou uma potencialidade para o perfil de polarização de macrófagos M1 (CD80) comparado ao controle M0.

4.4 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO ATRAVÉS DA REACÇÃO DE Griess

Em muitos processos fisiológicos e fisiopatológicos há a participação do gás reativo óxido nítrico (NO). Respostas inflamatórias, frequentemente, são associadas a níveis elevados da molécula, além disso, a produção não regulada da mesma, pode causar estresse nitrosativo que leva a danos ao DNA e proteínas, lesões celulares e morte. Porém, quantificar sua produção com precisão é um desafio técnico, visto que o NO é rapidamente oxidado a nitrito (NO^{-2}) e/ou nitrato (NO^{-3}) pelo oxigênio, possui uma meia-vida muito curta na matriz biológica, além de rápida difusão (VARGAS-MAYA *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2003).

Uma alternativa é estimar a produção integrada de NO através da determinação das concentrações de nitritos/nitratos, como na reação de Griess, onde o nitrito é tratado com um reagente diazotizante, sulfanilamida (SA), em meio ácido formando o sal transitório diazóico, que irá reagir com o agente de acoplamento, dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NED), formando um azoto estável. A cor púrpura intensa do produto da reação permite a mensuração de concentrações de nitritos de no mínimo cerca de 0,5 mM (SUN *et al.*, 2003).

Figura 12: Quantificação pela Reação de Griess da produção de NO^{-2}



Quantificação da produção de nitritos por macrófagos da linhagem J774.A1, empregando-se os sobrenadantes da polarização.

Se a quantidade de espécies reativas de nitrogênio se relaciona positivamente a processos inflamatórios, isto é, quanto maior o nível de NO encontrado, mais propenso o meio estará de um estado inflamatório. Então, pela análise gráfica, é possível afirmar que o estresse nitrosativo esperado ao grupo controle M1 I (perfil inflamatório) foi confirmado, sendo ainda o maior observado, comparado aos demais tratamentos e grupo controle M0.

Paralelamente, observou-se ainda para o grupo M2 II (perfil anti-inflamatório) um nível menor de estresse nitrosativo, como conjecturado.

Com relação aos macrófagos tratados com a proteína Sm14 e com a combinação de ambas as proteínas recombinantes (Sm14 + SmCyp), observou-se certa produção de nitrito, no entanto, menor, que o grupo controle M1 I (perfil inflamatório). Ratificando o observado na citometria, onde o grupo Sm14 tendeu ao perfil de polarização intermediária (M1/M2) e a combinação das proteínas, que na citometria tendenciou a um perfil de polarização inflamatória (perfil M1). Ou seja, para ambos os tratamentos, era esperado a produção de NO mais próximas ao perfil M1, do que ao perfil M2.

Em contrapartida, os grupos que na citometria tendenciaram a perfis M2, (M2 II, PT e SmCyp) aqui apresentaram menor produção de nitrito. Corroborando com o previsto a um perfil mais próximo do anti-inflamatório.

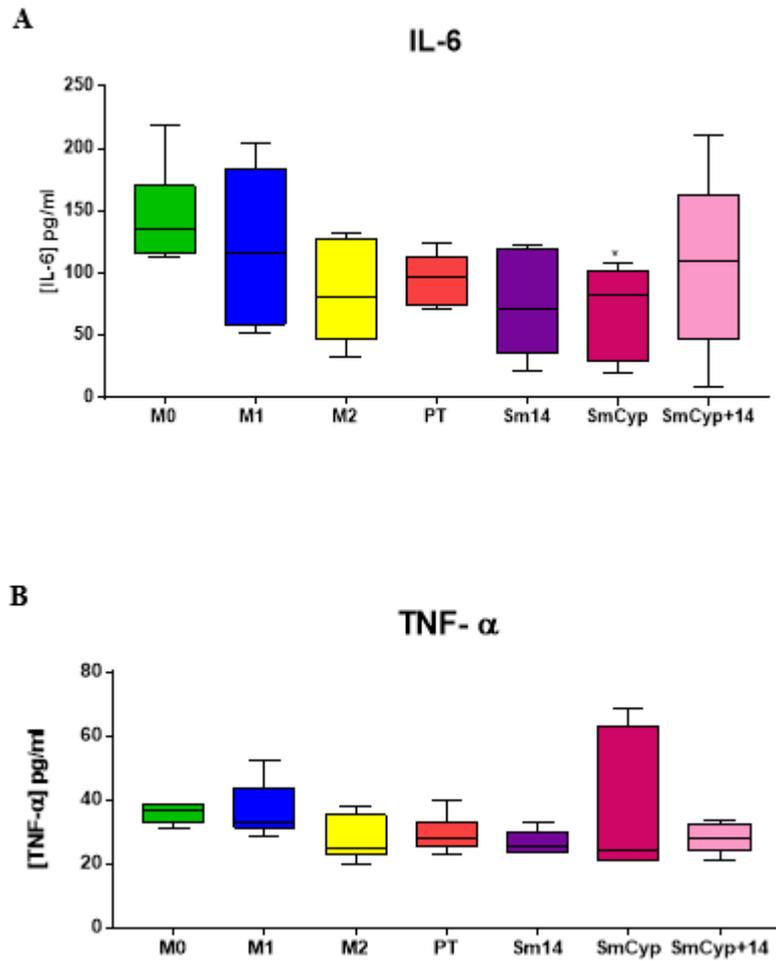
4.5 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS POR ELISA

Foram realizadas tentativas de quantificação das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α através do ELISA direto, empregando os sobrenadantes dos MTTs, no entanto, não houve sucesso nas detecções de nenhuma delas. Mais uma vez, muito provavelmente, a concentração celular e proteica podem ser determinantes para a ativação/polarização de macrófagos. Uma vez que, ao se utilizar os sobrenadantes do ensaio de polarização, foi possível detectá-las.

Para tal, foi realizado um ELISA direto para a quantificação das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α , as amostras do grupo controle da polarização (M1 e M2) foram selecionadas conforme o melhor resultado da citometria, ou seja, para a quantificação das citocinas nesses grupos controles de perfil de ativação de macrófagos, foram utilizados os sobrenadantes dos grupos M1 I (células tratadas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) + INF- γ humano (0,01 $\mu\text{g/mL}$)) e M2 II (células tratadas com IL-10 (0,01 $\mu\text{g/mL}$) + dexametasona ($3,2 \times 10^{-5}$ $\mu\text{g/mL}$)) que apresentaram melhor resposta frente os outros dois grupos M1 II e M2 I.

Foram empregados ainda os sobrenadantes do grupo M0 e dos grupos de provável atividade imunomodulatória (Sm14, SmCyp, Sm14+Cyp e PT). Tendo sido possível a quantificação de IL-6 e TNF- α como ilustrado no gráfico da Figura 13.

Figura 13: Quantificação por ELISA direto das citocinas IL-6 e TNF- α



A. Concentrações de IL-6 nas condições experimentais testadas. **B.** Concentrações de TNF- α nas condições experimentais testadas. O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre os resultados dos grupos tratados quando comparados ao controle (M0).

Sendo assim, a quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , corroboram com os dados obtidos na citometria de fluxo. Uma vez que, o grupo M1 e o tratado com a combinação de ambas as proteínas recombinantes (Sm14+Cyp), que na citometria apresentaram tendência aumentada a perfil inflamatório de macrófagos, pelo ELISA indicaram, para ambas as citocinas, maiores concentrações quando comparados ao grupo controle M0.

Seguido do grupo tratado com a Sm14, que na citometria apresentou potencialidade a polarização a perfil intermediário (M1/M2).

Os demais grupos, apesar de terem sido detectáveis ambas as citocinas, ficaram em menor concentração que os grupos de resposta Th1 identificados por citometria de fluxo.

A IL-10 não foi detectada nas condições experimentais testadas.

5. CONCLUSÕES

O DM2 é uma síndrome metabólica de fundamento múltiplo, decorrente de uma alta variação na resistência insulínica sistêmica e deficiência relativa da secreção do hormônio pelo pâncreas.

Além disso, está diretamente relacionado a fatores ambientais e genéticos, como sedentarismo, histórico familiar positivo, excesso de peso e/ou dieta desbalanceada, por exemplo, que refletem na produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos acometidos, uma vez que as comorbidades relacionadas a doença são danosas e irreversíveis em muitos casos.

Neste contexto, a inflamação do tecido adiposo acarreta a diferenciação e migração de células inflamatórias no próprio tecido e no fígado dos pacientes, gerando um quadro de inflamação crônica de baixo grau.

Sendo, portanto, a inflamação, obesidade e resistência insulínica, os propulsores do mecanismo imunoinflamatório. Neste cenário, a imunomodulação helmíntica, mostra-se uma ferramenta viável para a quebra do ciclo inflamatório.

As proteínas recombinantes do *Schistosoma mansoni*, Sm14 e SmCyp, nas condições experimentais propostas neste estudo, demonstram possuir um grande potencial para a função imunomodulatória, por apresentarem baixa citotoxicidade em macrófagos e hepatócitos com integridade da membrana e lisossoma das células. Nenhuma alteração ou lesão morfológica evidentes nesses dois tipos celulares, além de aparentarem favoráveis alterações na concentração de citocinas sintetizadas por macrófagos, atividade de polarização em macrófagos a perfis anti-inflamatório, inflamatório e intermediário, e variação na produção de espécies reativas de nitrogênio, com diminuição em condições anti-inflamatórias.

Tais dados, impulsionam estudos subsequentes no vasto universo das proteínas recombinantes de helmintos. Além disso, corroboram com investigações preliminares que empregaram diferentes moléculas e/ou partículas promissoras derivadas de helmintos, em doenças de perfil inflamatório crônico (como asma, artrite, gota, reumatismo e etc), cuja atividade imunomodulatória foi observada. Com atenuação da inflamação, pela diminuição da liberação de IL-6, inibição de neutrofilia e aumento na secreção de IL-10, IL-4 e IL-5, por exemplo.

De certa forma, é possível confirmar que o uso de subunidades de parasitos são uma ferramenta promissora como agentes terapêuticos imunomoduladores no tratamento de síndromes metabólicas, tão deletério e custoso aos pacientes e à saúde pública.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os estimulantes resultados obtidos, até então, incitam o aprofundamento da pesquisa, que irão envolver também ensaios com adipócitos e modelos animais, a fim de confirmar a atividade imunomodulatória das proteínas recombinantes testadas.

Desta forma faz-se necessário, novos ensaios de citometria com os macrófagos, determinação de protocolos de quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos, hepatócitos e adipócitos, além de ensaios de viabilidade, morfologia e ELISA em adipócitos (3T3-L1) e *Cytometric Bead Array (CBA) (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine)* para macrófagos e hepatócitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. A. E. *et al.* Sm14 of *Schistosoma mansoni* in Fusion with Tetanus Toxin Fragment C Induces Immunoprotection against Tetanus and Schistosomiasis in Mice. **INFECTION AND IMMUNITY**, Brasil, v. 72, n. 10, p. 5931-5937, 2004.
- AGUIAR, F. J. *et al.* C-reactive protein: clinical applications and proposals for a rational use. **Revista da Associação Médica Brasileira**, SÃO PAULO, v. 50, n. 1, p. 85-92, 2013.
- ATES, G. *et al.* Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. **Methods Mol Biol**, USA, v. 1601, n. 1, p. 19-26, 2017.
- BARRY, J. C. *et al.* Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. **Nature**, USA, v. 6, n. 21244, p. 1-9, 2016.
- BELLARY, S. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in older adults: clinical considerations and management. **Nature reviews endocrinology**, USA, v. 17, n. 1, p. 534-548, 2021.
- BERBUDI, A. *et al.* Parasitic helminths and their beneficial impact on type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, USA, v. 32, n. 3, p. 238-250, 2016.
- BOHNACKER, S. *et al.* What Can Parasites Tell Us About the Pathogenesis and Treatment of Asthma and Allergic Diseases. **Frontiers Immunology**, USA, v. 11, n. 2106, p. 1-8, 2020.
- BOVOLINI, A. *et al.* Metabolic Syndrome Pathophysiology and Predisposing Factors. **Int J Sports Med.**, Usa, v. 42, n. 3, p. 199-214, 2021.
- BRASIL, A. R. *et al.* C-reactive protein as an indicator of low intensity inflammation in children and adolescents with and without obesity. **Jornal de Pediatria**, RIO DE JANEIRO, v. 83, n. 5, p. 477-480, 2007.
- BREITSAMETER, Irene; FRAN, L. C. R; CARVALHO, C. B. D. DIABETES MELITO. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 24, n. 1, p. 217-221, 1994.
- BRITO, C. *et al.* Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v. 35, n. 1, p. 377-381, 2002.
- BUGLI, F. *et al.* Expression Cloning and Biochemical Characterizations of Recombinant Cyclophilin Proteins from *Schistosoma mansoni*. **PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION**, Italy, v. 12, n. 1, p. 340-346, 1997.
- CARDOSO, F. C. *et al.* *Schistosoma mansoni* tegument protein Sm29 is able to induce a Th1-type of immune response and protection against parasite infection. **PLoS Negl Trop Dis**, USA, v. 2, n. 10, p. 1-10, 2008.

CASTRO, A. D. A. E. *et al.* DIAGNOSTIC VALUE OF C-REACTIVE PROTEIN AND THE INFLUENCE OF VISCERAL FAT IN PATIENTS WITH OBESITY AND ACUTE APPENDICITIS. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 1-6, 2018.

CASTRO, C. A. D. *et al.* Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. **Int J Exp Pathol** ., São Paulo, v. 98, n. 1, p. 26-36, 2016.

CHANGXIA; RAO, Xiaoquan; ZHONG, Jixin. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. **Journal of Diabetes Research**, CHINA, v. 2017, n. 1, p. 1-6, 2017.

CHEN, Y. *et al.* Associação de Infecção Esquistossômica Anterior com Diabetes e Síndrome Metabólica: Um Estudo Transversal na China Rural. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, China, v. 98, n. 2, p. 283-287, 2013.

CORTEZ, D. N. *et al.* Complications and the time of diagnosis of diabetes mellitus in primary care. **Acta Paul Enferm**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 250-255, 2015.

DIABETES, S. B. D. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002: Diagnóstico e Classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 1-71, 2003.

DIABETES, S. B. D. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-383, 2018.

DIABETES, S. B. D. Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019 - 2020. **DIABETES**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-491, 2020.

DIMOVA, Rumyana; TANKOVA, Tsvetalina. The Role of Vaspin in the Development of Metabolic and Glucose Tolerance Disorders and Atherosclerosis. **BioMed Research International**, USA, v. 2015, n. 1, p. 1-7, 2015.

DOVEY, H F; MCKERROW, J H; WANG, C C. Action of tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules. **ELSEVIER**, USA, v. 16, n. 2, p. 185-198, 1985.

ERION, M. D. *et al.* Purine nucleoside phosphorylase. 1. Structure-function studies. **Biochemistry** , USA, v. 36, n. 39, p. 11725-11734, 1997.

EYAYU, Tahir; ZELEKE, Ayalew Jejaw; WORKU, Ligabaw. Current status and future prospects of protein vaccine candidates against *Schistosoma mansoni* infection. **ELSEVIER**, EUA, v. 1, n. 176, p. 1-10, 2020.

FINLAY, Conor M.; WALSH, Kevin P.; MILLS, K. H. G. Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. **Immunological Reviews**, DUBLIN, v. 259, n. 1, p. 206-230, 2014.

FRAGELLI, B. D. D. L. Efeito das enzimas recombinantes de *Schistosoma mansoni* Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase (HGPRT) e Purina Nucleosídeo Fosforilase (PNP) no tratamento da esquistossomose experimental. **UFSCar**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-111, 2018.

FRAGELLI, B. D. D. L. *et al.* Antitumor Effect of IL-2 and TRAIL Proteins Expressed by Recombinant Salmonella in Murine Bladder Cancer Cells. **Cellular Physiology & Biochemistry**, BRASIL, v. 55, n. 1, p. 460-476, 2021.

FRANCISQUETI, Fabiane Valentini; NASCIMENTO, A. F. D; CORRÊA, Camila Renata. Obesity, inflammation and metabolic complications. **Nutrire**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 81-89, 2015.

FUNES, Samanta C.; RIOS, Mariana; KALERGIS, J. E. A. A. M. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, EUA, v. 154, n. 2, p. 186-195, 2018.

GIBLETT, E. R. *et al.* Nucleoside-phosphorylase deficiency in a child with severely defective T-cell immunity and normal B-cell immunity. **Case Reports**, USA, v. 1, n. 7914, p. 1010-1013, 1975.

GOMES, Bárbara Festa; ACCARDO, C. D. M. Immunoinflammatory mediators in the pathogenesis of diabetes mellitus. **Einstein**, Brasil, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2018.

GORDON, Siamon; PLÜDDEMANN, Annette; ESTRADA, Fernando Martinez. Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. **Immunol Rev**, USA, v. 262, n. 1, p. 36-55, 2014.

GUZIK, T. J. *et al.* The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovasc Res**, usa, v. 113, n. 9, p. 1009-1023, 2017.

HERNÁNDEZ-DÍAZ *et al.* Omentina: papel en la resistencia a la insulina, inflamación y protección cardiovascular / Omentin: Role in insulin resistance, inflammation and cardiovascular protection. **Arch. cardiol. Méx**, MÉXICO, v. 86, n. 3, p. 233-243, 2016.

HUANG, Paul L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Dis Model Mech**, USA, v. 2, n. 5, p. 231-237, 2009.

HUSSAARTS, L. *et al.* Chronic helminth infection and helminth-derived egg antigens promote adipose tissue M2 macrophages and improve insulin sensitivity in obese mice. **The FASEB Journal**, USA, v. 29, n. 7, p. 3027-3029, 2016.

IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes facts & figures**. Disponível em: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>. Acesso em: 5 abr. 2021.

IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. Disponível em: <https://idf.org/>. Acesso em: 1 jan. 2021.

KEOUGH, D. T. *et al.* The crystal structure of free human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase reveals extensive conformational plasticity throughout the catalytic cycle. **ELSEVIER**, USA, v. 351, n. 1, p. 170-181, 2005.

KIANG, D. *et al.* Identification and characterization of Schistosoma mansoni p17.7, a cyclophilin'. **ELSEVIER**, USA, v. 76, n. 1, p. 73-82, 1996.

KUMAR, Priti; NAGARAJAN, Arvindhan; UCHIL, A. P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, USA, v. 1, n. 1, p. 469-472, 2018.

LAM, H. Y. P. *et al.* Increased immunogenicity and protection of recombinant Sm14 antigens by heat-killed Cutibacterium acnes in BALB/c mice infected with Schistosoma mansoni. **ELSEVIER**, China, v. 86, n. 1, p. 1-7, 2021.

LEITE, Lúcia Dantas; ROCHA, É. D. D. M; BRANDÃO-NETO, José. Obesity: an inflammatory disease . **Revista Ciência & Saúde**, PORTO ALEGRE, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009.

LIDDICOAT, Alex M.; LAVELLE, Ed C. Modulation of innate immunity by cyclosporine A. **ELSEVIER**, USA, v. 163, n. 1, p. 472-480, 2019.

LIDIA - LIGA INTERDICCIPLINAR DE DIABETES. **Complicações do Diabetes**. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lidia-diabetes/2017/05/13/complicacoes-do-diabetes/>. Acesso em: 2 mar. 2021.

LOWRY, O. H. *et al.* PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **ELSEVIER**, USA, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUCA, Carl De; OLEFSKY, Jerrold M. Stressed out about obesity and insulin resistance. **Nature**, EUA, v. 12, n. 1, p. 41-42, 2006.

LUMENG, Carey N.; BODZIN, Jennifer L.; SALTIEL, Alan R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest.**, USA, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

MAGALHÃES, W. L. E; LUNDGREN, Emanoela; LEME, T. D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **EMBRAPA**, BRASIL, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2018.

MAIZELS, Rick M.; MCSORLEY, Henry J. Regulation of the host immune system by helminth parasites. **Elsevier**, USA, v. 138, n. 3, p. 666-675, 2016.

MAIZELS, Rick M.; SMITS, Hermelijn H.; MCSORLEY, Henry J. Modulation of Host Immunity by Helminths: The Expanding Repertoire of Parasite Effector Molecules. **Elsevier**, USA, v. 49, n. 5, p. 801-818, 2018.

MAYER, L. E. *et al.* Perspectives on the laboratory evaluation of the inflammatory response. **Rev. Bras. Farm.**, BRASIL, v. 91, n. 4, p. 149-161, 2010.

MCLELLAN, K. C. P. *et al.* Type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and change in lifestyle. **Revista de Nutrição**, BRASIL, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2007.

MELO, T. T. D. Avaliação da resposta imunológica e mecanismos efetores associados à proteção induzida pela preparação antigênica do tegumento do esquistossômulo do *Schistosoma mansoni*. **TESE**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-181, 2014.

MELO, T. T. D. *et al.* The *Schistosoma mansoni* cyclophilin A epitope 107-121 induces a protective immune response against schistosomiasis. **Elsevier**, EUA, v. 111, n. 1, p. 172-181, 2019.

MOGANTI, K. *et al.* Hyperglycemia induces mixed M1/M2 cytokine profile in primary human monocyte-derived macrophages. **Immunobiology**, USA, v. 222, n. 10, p. 952-959, 2017.

MORAIS, S. B. D. Caracterização Funcional e Imunológica da proteína SmKI-1, um inibidor de serino protease do *Schistosoma mansoni*. Tese de Doutorado, **UFMG**, p. 1-187, jan./2018.

MORAIS, S. B. *et al.* *Schistosoma mansoni* SmKI-1 serine protease inhibitor binds to elastase and impairs neutrophil function and inflammation. **PLOS Pathogens**, BRASIL, v. 14, n. 2, p. 1-30, 2018.

MORENO-NAVARRETE, J. M. *et al.* Circulating omentin concentration increases after weight loss. **Nutrition & Metabolism**, BRASIL, v. 7, n. 27, p. 1-6, 2017.

MOTRAN, C. C. *et al.* Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. **Frontiers in Immunology**, USA, v. 9, n. 664, p. 1-12, 2020.

MU, Y. *et al.* Schistosome Infection and Schistosome-Derived Products as Modulators for the Prevention and Alleviation of Immunological Disorders. **Front. Immunol**, CHINA, v. 12, n. 1, p. 1-16, 2021.

MUSICK, W D. Structural features of the phosphoribosyltransferases and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism. **CRC Crit Rev Biochem**, USA, v. 11, n. 1, p. 1-34, 1981.

NERIS, Débora Meira. Imunização com enzimas de nucleotídeos de *S. mansoni* sobre o desenvolvimento da esquistossomose mansônica experimental. **UFSCar**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-104, 2012.

NERIS, Débora Meira. Imunização com enzimas de nucleotídeos de *S. mansoni* sobre o desenvolvimento da esquistossomose mansônica experimental. **MONOGRAFIA**, UFSCar, BRASIL, v. 1, n. 1, p. 1-104, 2012.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019**. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-revela-principais-causas-morte-e-incapacidade-em-todo-mundo-entre-2000-e>.

ORTIZ, J. N. M. Adiponectina, tnf- α e il-6 em pacientes portadores de obesidade grave. Relação com a sensibilidade à insulina e com a tolerância à glicose. **MONOGRAFIA**, UNICAMP, v. 1, n. 1, p. 1-100, 2007.

PALELLA, T D; KELLEY, W N. An approach to hyperuricemia and gout. **Geriatrics**, USA, v. 39, n. 11, p. 89-95, 1984.

PEARCE, Edward J; MACDONALD, Andrew S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, EUA, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

POCINHO, S. C. S. Antioxidantes naturais na diabetes mellitus tipo 2 e nas suas complicações. **UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**, Covilhã, Portugal, v. 1, n. 1, p. 1-50, abr./2017.

PRADEEPA, R; MOHAN, V. Prevalence of type 2 diabetes and its complications in India and economic costs to the nation. **Nature**. USA, v. 71, n. 1, p. 816-824, 2017.

PRADO, W. L. D. *et al.* Obesity and inflammatory adipokines: practical implications for exercise prescription. **Rev Bras Med Esporte**, BRASIL, v. 15, n. 5, p. 1-6, 2009.

RAMOS, C. R. *et al.* Stability improvement of the fatty acid binding protein Sm14 from *S. mansoni* by Cys replacement: Structural and functional characterization of a vaccine candidate. **ELSEVIER**, USA, v. 1794, n. 2009, p. 655-662, 2008.

RAMOS, C. R. R. A proteína ligadora aos ácidos graxos Sm14 de *Schistosoma mansoni*: Estrutura gênica, polimorfismo, expressão heteróloga em *E. coli* e significado estrutural e funcional das suas formas polimórficas e mutantes. **TESE**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-151, 2002.

REILLY, Shannon M; SALTIEL, Alan R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. **Nat Rev Endocrinol**, USA, v. 13, n. 11, p. 633-643, 2017.

REIS, J. S. *et al.* Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Belo Horizonte, MG, v. 52, n. 7, p. 1096-1105, jun./2008.

ROMANCIUC, Maria. Diabetes Mellitus Tipo 2 como Doença Inflamatória: anatomia, fisiopatologia e terapêutica. **UNIVERSIDADE DO ALGARVE, Faculdade de Ciências e Tecnologia**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-75, 2017.

ROMANELLO, Larissa. ESTUDOS DAS ENZIMAS ADENOSINA KINASE E HIPOXANTINA-GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE DE *Scistosoma mansoni*. **UFSCar**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-96, 2011.

SALTIEL, A R; KAHN, C R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, USA, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SAÚDE, Ministério Da. VIGITEL VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO: Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018. **Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, BRASÍLIA, v. 1, n. 1, p. 1-131, 2019.

SEEGMILLER, J E; ROSENBLOOM, F M; KELLEY, W N. Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. **Science**, USA, v. 155, n. 3770, p. 1682-1684, 1967.

SILVA, Fábio Mambelli. Estudo do potencial biotecnológico da proteína SmKI-1 do *Schistosoma mansoni*: aplicabilidade de seu domínio Kunitz como uma molécula anti-inflamatória e de seu domínio C-terminal como candidato à uma vacina anti-esquistossomótica. Tese de Doutorado, **UFMG**, p. 1-183, ago./2020.

SIPPEL, C. *et al.* INFLAMMATORY PROCESSES OF OBESITY. **Revista de Atenção à Saúde, BRASIL**, v. 12, n. 42, p. 48-56, 2014.

SIQUEIRA, P. R. D. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM HEPATÓCITOS DE PEIXE ZEBRA (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). UMA ABORDAGEM IN VITRO. **TESE, BRASIL**, v. 1, n. 1, p. 1-57, 2016.

SOUZA, J. R. T. D. Caracterização estrutural e funcional de duas Nucleosídeos Fosforilases de *Schistosoma mansoni*. **USP, Brasil**, v. 1, n. 1, p. 1-189, 2016.

STOECKLER; J.D. Developments in Cancer Chemotherapy. **Boca Ranton, USA**, v. 1, n. 1, p. 35-60, 1984.

SU, C. W. *et al.* Helminth infection protects against high fat diet-induced obesity via induction of alternatively activated macrophages. **Nature**, USA, v. 8, n. 4607, p. 1-14, 2018.

SUN, Jie; ZHANG, Xueji; FEIN, M. B. A. H. Measurement of Nitric Oxide Production in Biological Systems by Using Griess Reaction Assay. **SENSORS, China**, v. 2003, n. 3, p. 276-284, 2003.

SURENDAR, J. *et al.* Immunomodulation by helminths: Similar impact on type 1 and type 2 diabetes? **Parasite Immunol, USA**, v. 39, n. 5, p. 1-15, 2016.

TANG, Chun-lian; LIU, Zhi-ming; XIONG, Y. R. G. E. F. *Schistosoma* Infection and *Schistosoma*-Derived Products Modulate the Immune Responses Associated with Protection against Type 2 Diabetes. **Front Immunol, USA**, v. 8, n. 1990, p. 1-8, 2018.

TENDLER, Miriam; SIMPSON, Andrew J.g. The biotechnology-value chain: Development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **ELSEVIER, EUA**, v. 108, n. 1, p. 263-266, 2008.

TIMMERS, L. F. S. M. *et al.* Dinâmica Molecular da Hipoxantina-Guanina Fosforribosil Transferase de *Mycobacterium tuberculosis*. **PUCRS, Brasil**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2009.

TORRES, Rosa J; PUIG, Juan G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. **Orphanet J Rare Dis, USA**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2007.

TRUSCOTT, M. *et al.* *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion. **AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, EUA**, v. 81, n. 1, p. 133-142, 2013.

VAGLIENTI, M. V. *et al.* Quantification of Reactive Oxygen Species Using 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate Probe and Flow-Cytometry in Müller Glial Cells. **J Vis Exp.** USA, v. 183, n. 1, p. 1-30, mai./2022.

VARGAS-MAYA, N. I. *et al.* Refinement of the Griess method for measuring nitrite in biological samples. **ELSEVIER**, USA, v. 187, n. 1, p. 1-8, 2021.

WENSVEEN, F. M. *et al.* The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **Eur J Immunol**, EUROPA, v. 45, n. 9, p. 1-11, 2015.

WIEDEMANN, Marie; VOEHRINGER, David. Immunomodulation and Immune Escape Strategies of Gastrointestinal Helminths and Schistosomes. **Front Immunol**, USA, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.

XIA, Chang; RAO, Xiaoquan; ZHONG, Jixin. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. **J Diabetes Res**, USA, v. 2017, n. 1, p. 1-6, 2017.

XU, Y. *et al.* Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry. **Biochemistry**, USA, v. 36, n. 12, p. 3700-3712, 1997.

YE, Jianping. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Front Med.**, USA, v. 7, n. 1, p. 14-24, 2013.

ZHANG, H. *et al.* M2-specific reduction of CD1d switches NKT cell-mediated immune responses and triggers metaflammation in adipose tissue. **Nature**, China, v. 2018, n. 5, p. 506-517, 2018.

ZHAO, G. *et al.* Possible Role of Interleukin-1 β in Type 2 Diabetes Onset and Implications for Anti-inflammatory Therapy Strategies. **PLoS Comput Biol**, Germany, v. 10, n. 8, p. 1-16, 2014.

ZHENG, Yan; LEY, Sylvia H.; HU, Frank B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature reviews endocrinology**, USA, v. 14, n. 1, p. 88-98, 2018.